1900

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Leipzig.)

Ueber den

Einfluss der Reaction des Nährbodens

auf die

Vermehrung des Choleravibrio.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der Medicin, Chirurgie und Geburtshülfe.

Einer Hohen medicinischen Fakultät

der Universität Leipzig

vorgelegt von

Arthur Läwen

approb. Arzt

aus Waldheim.

Leipzig.

Druck von Bruno Georgi

1900.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Leipzig.)

Ueber den

Einfluss der Reaction des Nährbodens

auf die

Vermehrung des Choleravibrio.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der Medicin, Chirurgie und Geburtshülfe.

Einer Hohen medicinischen Fakultät

der Universität Leipzig

vorgelegt von

Arthur Läwen

approb. Arzt

aus Waldheim.

Leipzig.

Druck von Bruno Georgi

1900.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
zu Leipzig. 28. Juli 1900.

Referent: Herr Geh. Med. Rat Prof. Dr. Hofmann.

Meinen Eltern.

Versuche über das Verhalten von Bakterien gegen Säuren und Alkalien sind ihrer praktischen Bedeutung wegen schon vielfach angestellt worden. In der Regel wurden verschiedene Mengen dieser Stoffe den Nährböden zugesetzt, und nun entweder die von ihrer Einwirkung ausgehenden Absterbebedingungen der Keime untersucht, um hieraus wichtige Schlüsse für die Desinfektionslehre zu gewinnen, oder die für das Bakterienwachstum optimale Reaktion des Nährsubstrates festgestellt. In der ersten Zeit gingen die Bestrebungen dahin, einen Universalnährboden zu erhalten, auf dem man im Laboratorium in kurzer Zeit eine möglichst üppige Kultur der wichtigsten pathogenen Keime erzeugen könnte. Später würdigte man auch die rein biologische Seite derartiger Versuche. Man lernte so die hohe Abhängigkeit des Bakterienleibes in Stoffumsatz, chemischer Zusammensetzung, Wachstumsform und Vermehrungsgeschwindigkeit vom Aziditätsgrade des Nährbodens kennen. Als wichtigste Folgerung ergab sich, dass die einzelnen Keimarten ganz verschiedene Anforderungen an die Reaktion ihres Nährsubstrates stellten, dass zur vollen Entfaltung ihrer vitalen Kräfte, wie sie sich am deutlichsten in der Vermehrungsgeschwindigkeit ausdrückte, ein ganz bestimmter Grad der Azidität oder Alkalinität des Nährbodens nötig war. Freilich zeigte sich auch hier wiederum die wunderbare, dem zusammengesetzten Organismus so verhängnisvolle Anpassungsfähigkeit

der Bakterien, vermöge deren sie auch bei ungünstiger Reaktion des Nährsubstrates durch entsprechende Regulierung von Stoffwechsel und chemischer Zusammensetzung diese Schädlichkeiten in gewissem Grade überwinden und zu einer reichlichen Vermehrung gelangen konnten.

Herr Geheimer Medizinalrat Professor Dr. F. Hofmann stellte mir die Aufgabe, die Abhängigkeit der Choleravibrionen von der Reaktion des Nährbodens zu prüfen. Die eben beendeten, im hiesigen hygienischen Institut angestellten Versuche Fickers[1]) mussten gerade die Erreger der asiatischen Cholera wegen ihrer hohen Befähigung auf kleine Aenderungen der Aussenbedingungen hin in ausserordentlich feiner Weise zu reagieren, besonders zu derartigen Versuchen geeignet erscheinen lassen. Durch quantitative Keimbestimmungen sollte die Abhängigkeit der Vermehrungsgeschwindigkeit der Cholerakeime von kleinen Reaktionsschwankungen des Nährbodens zum zahlenmässigen Ausdruck gebracht werden. Die zu diesem Zwecke angestellten Versuche sind unter Anleitung von Herrn Geheimrat Hofmann im hygienischen Institut der Universität Leipzig im Winter 1898/99 und Sommer 1899 ausgeführt worden.

1. Allgemeine Versuchsmassnahmen.

Da womöglich Ausschläge in den Keimzahlen auf kleine Aziditätsschwankungen des Nährbodens hin erhalten werden sollten, wurden die nach den bisherigen Untersuchungen fast ausnahmslos auch in grossen Verdünnungen noch stark keimtötend auf die Choleravibrionen wirkenden freien Säuren nicht mit in die Versuchsreihe aufgenommen.

Ausgegangen wurde von dem nach der im Leipziger

[1]) Ficker, Ueber Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1899, Band XXIX. S. 1.

hygienischen Institut üblichen Weise aus magerem Rindfleisch gleich in grösseren Portionen hergestellten Fleischwasser mit 1 % Pepton- (peptonum siccum-Witte-Rostock) und 0,5 % Kochsalzzusatz. Dasselbe wurde 2 h. lang in Flaschen mit Patenthebelverschluss durch strömenden Dampf sterilisiert und drin als dauernd haltbare Vorratslösung aufbewahrt.

Wie Petri und Maassen[1]) betonen reagiert dies Fleischwasser amphoter, das heisst sauer für blaues Lackmuspapier, schwach alkalisch für empfindliches rotes Lackmuspapier, deutlich alkalisch für rotes Lackmoidpapier. Grund zu diesem Verhalten geben die im Fleischwasser gelösten Salze der Phosphorsäure. Die primären Salze dieser dreibasischen Säure verhalten sich gegen Lackmusfarbstoffe wie eine Säure, die sekundären wie eine Base, die tertiären stark alkalisch. Der Kürze wegen ist im folgenden dies amphoter reagierende Fleischwasser als saures Fleischwasser bezeichnet worden. Nach übereinstimmendem Urteil eignet sich dasselbe seiner Reaktion wegen nicht als Nährboden für die alkaliliebenden Cholerakeime. Um es dazu geeignet zu machen, bedarf es noch der Neutralisation, das heisst der Ueberführung der primären Salze in sekundäre und tertiäre, bezüglich eines noch darüber hinausgehenden Alkalizusatzes. Zur Erreichung dieses Zweckes sind verschiedene Alkalien benutzt worden, vor allem Aetznatron, Aetzkali und Soda. Bei dem unbestimmten Begriff des Neutralen sind ebenso die verschiedensten Indikatoren geprüft worden. Das Feld behaupten gegenwärtig wohl die Lackmusfarbstoffe und Phenolphthalein.

Schultz[2]) gelangte bei der Agartitrierung nach wieder-

---

[1]) Petri und Maassen, Ueber die Bereitung der Nährbouillon für bakteriologische Zwecke. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt. 1893, Band VIII. S. 311.

[2]) Schultz, Zur Frage der Bereitung einiger Nährsubstrate. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1891, Band X. S. 52.

holten Versuchen mit Phenolphthalein, Rosolsäure, Methylorange und Lackmustinktur zur Ueberzeugung, dass Phenolphthalein am zweckentsprechendsten ist. Sie hebt besonders die grosse Empfindlichkeit des Phenolphthaleins hervor und betont, „dass es sehr genau den Uebergang von saurer zur alkalischen Reaktion anzeige. Bei saurer Reaktion ist die Lösung farblos, bei alkalischer schwach rosa bis intensiv rot, je nachdem wie viel freies Alkali in Lösung ist". Wie Petri und Maassen angeben, wird farbloses Phenolphthalein von den primären und sekundären phosphorsauren Salzen nicht verändert, von den tertiären dagegen rot gefärbt. Schultz benutzte zur Neutralisierung Aetznatronlösung. Nach ihrer Angabe entsteht bei der Anwendung von Soda freie CO_2, die einige Indikatoren, z. B. auch Phenolphthalein, beeinflusst, dass man noch mit sauren Flüssigkeiten zu thun zu haben glaubt, wenn dieselben schon neutral oder sogar alkalisch gemacht worden sind. Die Lösung hält Schultz dann für neutral, wenn nach einem Zusatz von einem Tropfen (ca. 0,05 cc) Aetznatronlösung die rote Farbe auftritt. „Die rote Färbung durch Phenolphthalein bedeutet, dass schon freies Alkali in der Lösung enthalten ist, dieselbe also alkalisch ist."

Schultz titrierte also schon ihre Nährböden. Dass man nur durch titrimetrische Bestimmung mit Anwendung von Phenolphthalein und Lackmoidpapier als Indikatoren eine zuverlässige Auskunft über die Azidität oder Alkaleszenz einer Flüssigkeit erhalten kann, wurde aber zuerst von Petri und Maassen betont. Da eine nach Schultz'scher Vorschrift neutralisierte Lösung nur noch sekundäre Phosphate enthält, eine Anzahl von Bakterien aber die reichlich vorhandenen sekundären Phosphate nicht liebt, diesen vielmehr primäre Phosphate lieber sind, empfehlen Petri und Maassen das Alkalitätsoptimum besonders festzustellen. Sie bestimmen die

Alkalenszenz einer jeden Bouillon für Penolphthalein (Phenolphthaleinbouillon) und für Lackmus (Tüpfelprobe auf empfindlichem blauem Lackmuspapier bis zur schwachen Verstärkung des blauen Farbentones — Lackmusbouillon). Das Alkalitätsoptimum liegt nach ihrer Angabe für die meisten Bakterien zwischen dem Gehalt der Lackmusbouillon und dem der Phenolphthaleinbouillon. Meist brauchen 10 cc Bouillon bis zur Lackmusreaktion 1,8 cc. bis zur Phenolphthaleinreaktion 3 cc $^1/_{10}$ Normalnatronlauge. Nach einer späteren Arbeit hält Maassen[1]) eine Bouillon dann für neutral, wenn sie auf den Lackmusblauneutralpunkt eingestellt ist. „Das siedend heisse Fleischwasser wird nach Hinzugabe von Pepton und Kochsalz solange mit Natronlauge versetzt (auf 1 Liter ungefähr 15 cc Normallauge), bis eine herausgenommene Probe auf glattem, blauvioletten, aus schwach geleimten s. g. Postpapier hergestellten Lackmuspapier neutral wie zum Vergleich darauf gebrachtes ausgekochtes destilliertes Wasser reagiert. Nach $^1/_4$-stündigem Erhitzen im Dampfe muss diese Fleischlösung nochmals auf ihre Reaktion geprüft und wenn nötig die angegebene Reaktion durch einige Tropfen Natronlauge wieder hergestellt werden.“ Auch nach Lehmann[2]) kann der mittelst Phenolphthalein neutral hergestellte Nährboden unbedingt als Universalnährboden empfohlen werden. Als neutrale Gelatine verwertet er einen Nährboden, der ebensoviel Natronlauge zugesetzt erhielt, als zur geringen Rötung eines Phenophthaleinzusatzes nötig ist. Es ist dann ein ganz bestimmter Punkt repräsentiert, wo alle freien Säuren und die sauren Salze in neutrale Salze

---

[1]) Maassen, Beiträge zur Differenzierung einiger dem Vibrio der asiatischen Cholera verwandter Vibrionen und kurze Angaben über eiweissfreie Nährböden von allgemeiner Anwendbarkeit. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt. 1894. Band IX. S. 402.

[2]) Lehmann und Neumann, Bakteriologische Diagnostik. 2. Aufl. 1899. Teil II. S. 24.

verwandelt sind. Heim[1]) verwendet ausschliesslich Nährmittel mit einer Alkaleszenz von 0,5 % Normalnatronlauge.

Im hiesigen hygienischen Institute ist es schon seit langen Jahren üblich das saure Fleischwasser mit Natron- oder Kalilauge unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator zu neutralisieren. Eine Portion des im Vorrat hergestellten Fleischwassers wird mit 10 Tropfen Phenolphthaleinlösung (2 g Phenolphthalein auf 100 cc Alkohol) versetzt, und dann aus einer Bürette tropfenweise soviel Alkali zugesetzt, bis die ganze Flüssigkeit beim Schütteln einen Stich ins Rot besitzt. Führt man diese Titrierung stets bei Tageslicht aus, so gewinnt man nach einiger Uebung ein sehr sicheres Urteil darüber, wieviel Alkali man zur Erreichung des bestimmten Farbentones zuzusetzen hat.

Auf Veranlassung von Herrn Geheimrat Hofmann ist diese Neutralisationsmethode auch bei vorliegenden Versuchen angewandt worden. Als Alkali wurde frisch hergestellte Normalnatronlauge benutzt. $^1/_{10}$ Normallauge würde die Lösungen zu sehr verdünnt haben. Die Azidität des Fleischwassers wurde durch die Anzahl der zur Neutralisation von 100 cc Fleischwasser verbrauchten cc Normalnatronlauge ausgedrückt. Setzt man nun soviel Alkali zu, bis die oben angegebene Phenolphthaleinreaktion eintritt, so ist das Fleischwasser bereits schwach alkalisch. Daher erreichten die von mir verbrauchten Alkalimengen zum Teil höhere Werte, als sie in der Litteratur angegeben sind. Hierzu kommen noch die vom Alter des Fleisches abhängigen Schwankungen in der Azidität der Bouillon. Bei den Versuchen wurden 2,6 cc bis 4,5 cc % Normalnatronlauge zur Neutralisation verbraucht. Die so mit Alkali behandelte Bouillon wurde als Fleischwasser neutral für Phenol-

[1]) Heim, Zur Bereitungsweise von Nährmitteln. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1895, Band XVII. S. 190.

phthalein bezeichnet. Dabei bin ich mir wohl bewusst, dass der gewählte Neutralpunkt nicht identisch ist mit dem der nach Schultz'scher Vorschrift neutralisierten Bouillon. Wie Petri und Maassen betonen, enthält die nach Schultz neutrale Bouillon nur noch sekundäre Phosphate, ist also im eigentlichen Sinne neutral für Phenolphthalein. Da es mir darauf ankam, auf einfache Weise einen sicheren Grenzpunkt für den Alkalizusatz zu erhalten, war mir die Methode der Neutralisation bis zur Phenolphthaleinreaktion scharf genug.

Das saure und das für Phenolphthalein neutrale Fleischwasser bildeten die Stammlösungen, von denen zur Zusammenstellung von Nährböden verschiedener Azidität ausgegangen wurde. Wie erwähnt, bestand die Absicht möglichst kleine Abstufungen in der Reaktion zu erhalten. Dies wurde dadurch erreicht, dass verschieden grosse Mengen sauren und neutralen Fleischwassers mit einander vermengt wurden. Die Azidität des neugebildeten Nährbodens ergab sich durch Berechnung. Betrug zum Beispiel der Säuregrad des sauren Fleischwassers 2,9 cc % Normalnatronlauge, und wurde eine neue Nährlösung aus 10 cc neutralem und 30 cc saurem Fleischwasser hergestellt, so berechnete sich die Azidität der erhaltenen 40 cc Fleischwasser auf 2.175 cc % Normalnatronlauge. Indem nun einerseits Fleischwasserlösungen verschiedener Azidität verwendet, andrerseits wechselnde Kombinationen zwischen dem sauren und neutralen Fleischwasser hergestellt wurden, gelang es auf einfache Weise, eine Reihe von Bouillonnährböden zu bilden, deren Aziditäten in einem bestimmten bekannten Verhältnis zu einander standen. Ich hoffte dabei, dass sich die erhaltenen Keimzahlen in gesetzmässige Beziehungen zu den bekannten Aziditätsabstufungen setzen liessen.

Bestimmte Mengen dieser Nährlösungen, in der Regel 40 oder 45 cc, kamen in die unten näher beschriebenen Tropf-

gläser. Dieselben waren nach sorgfältiger Reinigung mit heissem Wasser und nachfolgender Ausspülung mit destilliertem Wasser 2 h. lang im strömenden Dampf sterilisiert und dann im Trockenschrank getrocknet worden. In diesen mit Fliesspapierkappen versehenen Tropfgläsern wurden die Nährlösungen noch 20 Min. im strömenden Dampfe sterilisiert. Eine Aenderung der Reaktion nach dem Sterilisieren wurde nicht vorgenommen.

In der Litteratur finden sich mannigfache Angaben über durchs Erhitzen hervorgerufene Reaktionsänderungen namentlich der Nährgelatine. Stutzer und Burri[1]) stellten durch Versuche fest, dass Nährgelatine mit einem Zusatz von 1% Na_2CO_3 durch 5 Min. währendes Erhitzen im strömenden Dampf eine Alkaliverminderung auf 0.93% erfährt. Bei weiterem Erhitzen blieb der Alkalescenzgrad dann nahezu konstant. Auch Maassen[2]) korrigiert die Reaktion seiner Fleischlösungen nach dem Erhitzen nochmals durch einige Tropfen Natronlauge. Heim[3]) setzt seinen Nährböden mehr Alkali zu als zur Neutralisation nötig ist, weil sonst die Lösung beim Sterilisieren wieder sauer würde. Fuller[4]) neutralisiert die heissen Nährböden, um die Absorption der CO_2 der Luft zu verhindern. Dahmen[5])

[1]) Stutzer und Burri, Untersuchungen über die Bakterien der Cholera asiatica. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1893, Band XIV. S. 15.

[2]) Maassen, Beiträge zur Differenzierung einiger dem Vibrio der asiatischen Cholera verwandter Vibrionen und kurze Angaben über eiweissfreie Nährböden von allgemeiner Anwendbarkeit. Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt. 1894, Band IX. S. 403.

[3]) Heim, Zur Bereitungsweise von Nährmitteln. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1895, Band XVII. S. 190.

[4]) Fuller, On the proper reaction of nutrient media for bacterial cultivation. Journal of the Amerikan public Health association X. 1895. Referat: Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1896, Band XX. S. 333.

[5]) Dahmen, Die Nährgelatine als Ursache des negativen Befundes

erwähnt, dass, wenn die alkalische Bouillongelatine nicht lange genug (10 Min. bis $^1/_4$ St. sind erforderlich) gekocht worden ist, sie durch jedesmaliges Erhitzen weniger alkalisch, neutral oder je nach dem ursprünglichen Alkalescenzgrade sauer wird. Auch Deelemann[1]) klagt, dass sich Veränderungen des Nährbodens durch das Kochen mit Alkalizusatz unliebsam bemerkbar machten. Er betont, dass Nährböden mit höherem Alkaligehalt, die nach dem Alkalizusatz noch erhitzt wurden, in Bezug auf ihr Verhalten den Bakterien gegenüber, im Vergleich mit Nährböden gleicher Alkalität, die nach dem Alkalizusatz eine Erhitzung nicht mehr durchgemacht hatten, öfters Verschiedenheiten zeigten. Nach diesem Autor liegt das vielleicht daran, dass durch Einwirkung des Alkalis beim Erhitzen Zersetzungen des Nährbodens eintreten, wobei auch die Alkalität desselben etwas verändert wird. Nach Günther[2]) scheint das Nachsäuern der Nährgelatine beim Kochen bei der einen Gelatinesorte in höherem, bei der anderen in geringerem Grade aufzutreten.

Bei den zu vorliegenden Versuchen benutzten Fleischwassernährböden wurde eine Reaktionsänderung nach dem Sterilisieren nicht vorgenommen. Es wäre bei den gewählten kleinen Aziditätsschwankungen sehr schwierig und mit anderen Versuchsfehlern verbunden gewesen, wenn eine gegebenenfalls nötige Richtigstellung der Reaktion vorgenommen worden wäre. Andrerseits lehrten die auch nach der Sterilisation noch deutlichen Farbabstufungen der Lösungen, dass eine wesentliche Reaktionsänderung nicht eingetreten sein konnte.

---

bei Untersuchungen der Fäces auf Cholerabacillen. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1892, Band XII. S. 620.

[1]) Deelemann, Der Einfluss der Reaktion des Nährbodens auf das Bakterienwachstum. Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt. 1897, Band XIII. S. 378.

[2]) Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1898, 5. Aufl. S. 156.

Beim Sterilisieren im strömenden Dampfe bildeten sich in den Lösungen mit Alkalizusatz Niederschläge. Dieselben bestehen bekanntlich aus Kalk- und Magnesiumsalzen und haben in der Litteratur vielfach Erwähnung gefunden. Petri und Maassen[1]) halten durch Verarmung der Bouillon an diesen Salzen eine eventuelle Herabsetzung des Nährwertes für gewisse Bakterien für möglich. Nach Heim[2]) sind sie dem Bakterienwachstum nicht schädlich. Sie wurden ruhig in den Nährlösungen gelassen.

In sämtlichen Versuchen wurde eine von Herrn Prof. Dr. R. Pfeiffer-Berlin stammende, mir von Herrn Privatdozent Dr. Ficker übergebene Cholerakultur verwendet. Es ist dies dieselbe virulente Kultur, mit der Ficker seine den Choleravibrio betreffenden Untersuchungen über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen angestellt hatte. Die Kultur wurde zwischen den einzelnen Versuchen im Gelatinestich weiter gezüchtet. Das Keimmaterial wurde aus dem Flächenbelage einer 24 h. alten bei 25° C gewachsenen Gelatinestichkultur mit Platinöse entnommen und dann ins Aufschwemmungsmedium übertragen.

Von Ficker ist nachgewiesen worden, dass die als Verdünnungsmittel vielfach gebrauchte „sogenannte physiologische Kochsalzlösung weit davon entfernt ist, ein für die Cholerabacillen indifferentes Medium zu sein, vielmehr wirkt dieselbe unter Umständen in hohem Grade bakterizid". Diese keimtötende Eigenschaft der physiologischen Kochsalzlösung wird nach seinen Untersuchungen stark herabgesetzt, wenn in die Kochsalzlösung Nährmaterial, Pepton oder neutrale Bouillon gegeben wird. Nach Fickers Vorgange ist daher als Aufschwemmungsflüssigkeit eine stark verdünnte neutrale Bouillon

[1]) Petri und Maassen, l. c. S. 513.
[2]) Heim, l. c. S. 191.

verwendet worden. 100 cc destillierten Wassers erhielten einen Zusatz von 1 cc phenolphthaleinneutraler Bouillon und 0,5 cc Kochsalz. Nach Zugabe einiger Tropfen Phenolphthalein wurde soviel Normalnatronlauge zugesetzt, bis eine schwache Rosafärbung der Lösung eintrat. Je 25 cc dieser Verdünnungsflüssigkeit wurden in, wie oben angegeben, gereinigte Tropfgläser gegeben und drin 2 h lang im strömenden Dampfe sterilisiert. Der durch Verdampfung der auskühlenden Flüssigkeit entstehende geringe Flüssigkeitsverlust[1]) wurde vernachlässigt. Nach dem Auskühlen waren die Lösungen zum Gebrauche fertig. Infolge ihres Gehaltes an freiem Alkali zog diese Flüssigkeit begierig CO_2 aus der Luft an. Die dadurch bewirkte Säuerung konnte man beim längeren Stehen der Lösung deutlich an der Entfärbung erkennen. Manchmal bestand noch eine Rosafärbung, die aber beim Umschütteln der Gläser sofort verschwand. War die Säuerung noch nicht zu weit gegangen, so trat nach erneuter Sterilisation im strömenden Dampfe und dadurch bewirkter Austreibung der CO_2 die Rotfärbung wieder auf. Da sich diese durch CO_2 absorption bedingte Reaktionsänderung der Verdünnungslösungen besonders bei den ersten Versuchen unangenehm bemerkbar machte, wurden die Tropfgläser, welche zur Wahrung der Konstanz der Versuche gleich in grosser Anzahl bis zu 80 Stück beschickt waren, mit ihrem Inhalt aller 1—2 Tage wieder sterilisiert. Es kamen dann nur Verdünnungslösungen zur Verwendung, die eine deutliche Rosafärbung zeigten.

Bei den zahlreichen quantitativen Keimbestimmungen wurde durchweg die von Geheimrat Hofmann eingeführte Tropfglas-

---

[1]) M. Retter (Keimzahl und Wachstumsgeschwindigkeit der Choleraspirillen auf Platten. Inaug. Diss. Leipzig) bestimmte den Gewichtsverlust von 50—100 cc Kochsalzlösung nach $^1/_2$stündigem Sterilisieren im strömenden Dampf auf 0,05 g.

methode[1]) angewendet. Das Verfahren gestaltete sich folgendermassen: Benutzt wurden 90 50 und 100 cc haltende Tropfgläschen mit eingeschliffenem Glasstopfen. Die Tropfengrösse der einzelnen Gläschen wurde für vorliegende Versuche durch Wägung bestimmt und zwar wurde sie bei den Gläsern, die zur Aufnahme der Verdünnungsflüssigkeiten bestimmt waren, für Leitungswasser, bei denen, die den Nährlösungen zum Aufenthalt dienen sollten, für saures Fleischwasser festgestellt. Die Konstanz der Tropfengrösse eines jeden Gläschens, auf der die ganze Methode basiert, bestätigte sich durchweg. Bei jedem Tropfglase wurden 4 –6 Wägungen vorgenommen, und das Mittel als Tropfengrösse angenommen. Kamen z. B. auf 3 g je 47, 50, 49, 47, 47 Tropfen, so wurden als Mittelwert 48 Tropfen in Rechnung gezogen, und die Tropfengrösse auf 0.0625 g festgesetzt. Die Wassertropfengrösse schwankte bei den verschiedenen Tropfgläsern zwischen 0.0612 g und 0.0732 g, die Fleischwassertropfengrösse zwischen 0.0517 g und 0.0588 g. Bei den quantitativen Bestimmungen wurde der Keimgehalt eines Grammes der Nährlösung berechnet. Folgendes Beispiel möge den dabei verfolgten Modus erläutern:

Das sterilisierte Tropfglas I wurde mit 40 cc neutralem Fleischwasser beschickt. In diesem wurde eine Oese 24 h alter Cholerakultur aufgeschwemmt. Das Tropfglas wurde nun auf 24 h in den Brütschrank bei 25° C gestellt. Es sollte die Keimzahl im Gramm der Lösung bestimmt werden. Zu diesem Zwecke wurde das Papierdach entfernt. 5 Tropfen der Lösung wurden in ein Schälchen mit Karbolseife abgetropft, um etwa am Schnabel des Stopfens hängende Keime zu entfernen; dann kamen 5 Tropfen in das mit 25 cc steriler Verdünnungsflüssig-

[1]) Die Methode ist näher beschrieben in M. Ficker, Ueber Wachstumsgeschwindigkeit des Bacterium coli commune auf Platten. Dissertation. Leipzig 1893.

keit gefüllte Tropfglas II. Dasselbe wurde 1 Min. lang vorsichtig geschüttelt, wobei möglichst die Bildung von Luftblasen sowie die Befeuchtung des Glasstopfens vermieden wurde. 5 Tropfen dieser Aufschwemmung wurden sodann in das Tropfglas III gegeben, das ebenfalls mit 25 cc Verdünnungsflüssigkeit beschickt war. Dasselbe wurde ebenso behandelt wie Tropfglas II. Dann wurden mit je 5 Tropfen dieser Aufschwemmung die Gelatineplatten α und β gegossen. Diese Platten wurden 24 h lang bei 25° C gehalten und dann gezählt. Zur Zählung benutzte ich ein Plattenzählmikroskop der Firma Leitz mit den Okularen 1 und 4, dem Objektiv 3 und einem Okularnetzmikrometer. Die Gesichtsfeldkonstanten waren von Herrn Dr. Ficker berechnet und tabellarisch zusammengestellt worden. Die Zählung wurde nach den von M. Neisser[1]) entwickelten Grundsätzen ausgeführt.

Fanden sich auf der Platte α 38300, auf der Kontrollplatte β 38500 Kolonien, so gestaltete sich die Berechnung nach folgender Ueberlegung: Die mittlere Tropfengrösse der 3 Gläser betrug für I 0,0652 g, II 0, 0698 g, III 0,0714 g. Da die Platten mit 5 Tropfen aus der Verdünnung III gegossen waren, in Tropfglas III sich die Keime von 5 Tropfen aus Tropfglas II, in Tropfglas II aber die von 5 Tropfen aus der Nährlösung in Tropfglas I befanden, so ergab sich nach einfachen Ansätzen, dass in 1 Gramm der Nährlösung

$$\frac{38300 \cdot 25 \cdot 25}{0{,}357 \cdot 0{,}349 \cdot 0{,}326}$$ bezüglich $$\frac{38500 \cdot 25 \cdot 25}{0{,}357 \cdot 0{,}349 \cdot 0{,}326}$$ Keime

sein mussten. Die Berechnung geschah mit Hülfe von 5stelligen Logarithmen. Im gewählten Beispiel hätten sich im Gramm der Nährlösung 589 bezüglich 592, im Mittel also 591 Millionen Keime gefunden.

[1]) M. Neisser, Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1895, Band XX. S. 119.

War die Aussaat wenig dicht, oder wurde die Keimbestimmung nur kurze Zeit nach der Aussaat ausgeführt, so wurde nur 1 Verdünnung genommen oder ganz auf Verdünnungen verzichtet.

Die verwendete Nährgelatine wurde nach Prof. F. Hofmanns Vorschrift aus der im Vorrat hergestellten Fleischwasserlösung unter Zusatz von 5% weisser Speisegelatine und 3% Glycerin gleich in grösserer Menge bereitet. Die Neutralisation geschah durch Zutropfen von Normalnatronlauge unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator bis zum Auftreten eines roten Schimmers beim Umschütteln der Lösung.

2. Versuche.

Versuch 1. In 2 sterilisierte Erlenmeyerkölbchen kamen je 100 cc des im Vorrat hergestellten sauren Fleischwassers. Die erste Portion wurde mit 2,9 cc Normalnatronlauge bis zum Eintritt der Phenolphthaleinreaktion neutralisiert; der zweiten wurden 2,99 cc destillierten Wassers zugesetzt. Von diesen Nährlösungen kamen in

Tropfglas I 40 cc Fleischwasssr neutral für Phenolphthalein;

Tropfglas II 30 cc Fleischwasser neutral und 10 cc sauren Fleischwassers;

Tropfglas III 10 cc Fleischwasser neutral und 30 cc sauren Fleischwassers;

Tropfglas IV 40 cc sauren Fleischwassers.

Die Azidität der Nährlösungen berechnete sich in Tropfglas II auf 0,725cc, Tropfglas III auf 2,175cc, Tropfglas IV auf 2,900cc% Normalnatronlauge. Die Gläser wurden mit ihrem Inhalt 20 Minuten im strömenden Dampf sterilisiert.

Von einer 24h alten Choleragelatinestichkultur wurde eine Platinöse in einem Tropfglase mit 25cc der Verdünnungsflüssigkeit aufgeschwemmt (Original), von dieser Suspension je

5 Tropfen in die Gläser I bis IV gegeben, und sofort der Keimgehalt dieser 5 Tropfen aus dem Original und derjenige der 4 Tropfgläser bestimmt. Sodann wurden die Tropfgläser im Brütschrank bei 24—25° C gehalten, und Keimbestimmungen nach 3h, 9h, 24h, 2d, 4d, 7d, 8d und 10d gemacht. Die Gelatineplatten wurden gezählt, nachdem sie 24h bei 24—25° C gehalten waren.

Der Keimgehalt des Originales betrug für 5 Tropfen (Okular 4, Okularnetzmikrometer, Objektiv 3, gezählt in 50 Gesichtsfeldern je 1 kleines Quadrat) 602 000, nach der Kontrollbestimmung 856 000 Keime. Hieraus berechnet sich die Zahl der in die Tropfgläser I—IV gegebenen Keime für 1 Gramm auf 15 100 bezüglich 21 400, im Mittel also auf 18 300 Keime. Die direkten Keimbestimmungen der in den Gläsern I bis IV befindlichen Suspensionen ergab folgende Zahlen (Okular 1, Objektiv 3, 60 Gesichtsfelder):

Tropfglas	α	β	Mittel
I	19 400	19 400	19 400
II	17 600	16 100	16 900
III	10 800	13 200	12 000
IV	8 100	9 700	8 900

Die Resultate der übrigen Keimbestimmungen finden sich in den Versuchstabellen.

Versuch 2. Anordnung genau wie beim ersten Versuch; nur wurden die Keimbestimmungen an 2 Reihen von Tropfgläsern vorgenommen, die unter einander wieder eine Kontrolle abgeben sollten. Neutralisation des sauren Fleischwassers mit 2,6cc % Normalnatronlauge. Zusatz von ebensoviel destilliertem Wasser zum sauer bleibenden Fleischwasser. Beschickung der Tropfgläser:

Tropfglas I und 1 40cc Fleischwasser neutral für Phenolpthalein.

Tropfglas II und 2 30cc Fleischwasser neutral und 10cc sauren Fleischwassers.

Tropfglas III und 3 10cc Fleischwasser neutral und 30cc sauren Fleischwassers.

Tropfglas IV und 4 40cc sauren Fleischwassers.

Azidität der Nährlösungen in den Tropfgläsern II und 2 0.65cc, III und 3 1,95cc, IV und 4 2,6cc% Normalnatronlauge.

20 Minuten lang Sterilisation der Gläser mit Inhalt im strömenden Dampf. Aus der Originalaufschwemmung von 1 Oese 24h alter Choleragelatinestichkultur in 25cc Verdünnungsflüssigkeit kamen 5 Tropfen in die Gläser I bis IV und 1 bis 4. Feststellung des Keimgehaltes von 5 Tropfen der Originalaufschwemmung und des der 8 Tropfgläser. Die Gläser wurden bei 24—25° C gehalten, und Keimbestimmungen nach 3h, 6h, 9h, 24h, 2d, 4d, 7d, 10d, 13d und 20d gemacht. Plattenzählung wie beim 1. Versuch.

Der Keimgehalt des Originals betrug für 5 Tropfen (Okular 4, Objektiv 3, Okularnetzmikrometer, gezählt je 5 Quadrate in 30 Gesichtsfeldern) nach 4 Kontrollbestimmungen 182 200, 172 800, 167 400 und 214 700 Keime. Hieraus berechnete sich die Zahl der in die Tropfgläser I bis IV und 1 bis 4 gegebenen Keime für 1 Gramm auf 4600, 4300, 4200 und 5400, im Mittel also auf 4600 Keime. Die direkte Keimbestimmung der bei Beginn des Versuches in den Gläsern befindlichen Suspensionen ergab folgende Zahlen (Lupenzählung):

Tropfglas	α	β	Mittel
I	2900	3200	3100
1	2700	2900	2800
II	2900	2700	2800
2	3200	2300	2800
III	3200	3300	3300
3	2900	2900	2900
IV	2700	4100	3400
4	2400	2500	2500

Die übrigen Keimzahlen finden sich in den Versuchstabellen:

Versuch 3. Dieser Versuch wurde vorgenommen, um das Verhalten der Choleravibrionen in den Nährlösungen während der ersten 24h zu beobachten. Daher wurde der Keimgehalt der Tropfgläser aller 3h bestimmt. Neutralisation des sauren Fleischwassers mit 4,5 cc % Normalnatronlauge. Zusatz derselben Menge destillierten Wassers zum sauer bleibenden Fleischwasser. Beschickung der Tropfgläser:

Tropfglas I und 1 45 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein.

Tropfglas II und 2 30 cc Fleischwasser neutral und 15 cc sauren Fleischwassers.

Tropfglas III und 3 15 cc Fleischwasser neutral und 30 cc sauren Fleischwassers.

Tropfglas IV und 4 45 cc sauren Fleischwassers.

Aziditäten der Nährlösungen in den Tropfgläsern II und 2 1,5 cc, III und 3 3,0 cc, IV und 4 4,5 cc % Normalnatronlauge. Die Gläser wurden mit Inhalt 20 Minuten sterilisiert. Tropfglas 1 zersprang und musste ausgeschaltet werden.

Aufschwemmung einer Oese 24 h alter Choleragelatinestichkultur in Tropfglas mit 25 cc Verdünnungsflüssigkeit (Original). Von dieser Suspension wurden je 5 Tropfen in die Gläser I bis IV und 2 bis 4 gegeben, und sodann der Keimgehalt des Originals und der 7 Tropfgläser bestimmt. Die Gläser wurden bei 24 bis 25° C gehalten, und aller 3 h der Keimgehalt bestimmt. Plattenzählung wie bei den ersten Versuchen.

In 5 Tropfen des Originals fanden sich (Okular 1, Objektiv 3, in 60 Gesichtsfeldern das Gesamtquadrat des Okularnetzmikrometers gezählt) nach 4 Kontrollbestimmungen 80 100, 72 200, 85 000 und 88 200 Keime. Hieraus berechnet sich der

Keimgehalt der 7 Tropfgläser für 1 Gramm auf 1800, 1600, 1900 und 2000, im Mittel also auf 1800 Keime. Die im Anfang des Versuches vorgenommene direkte Bestimmung des Keimgehaltes der 7 Gläser ergab folgende Werte (Lupenzählung):

Tropfglas	α	β	Mittel
I	2000	1900	2000
II	1600	1700	1700
2	1900	1900	1900
III	2100	2200	2200
4	1900	2000	2000
IV	2100	2100	2100
4	2200	2000	2100

Die übrigen Keimzahlen finden sich in den Versuchstabellen.

Im Verlaufe dieses Versuches zeigte sich, dass zu wenig Verdünnungen angewendet waren. Die Platten waren zum Teil so dicht besät, dass einzelne Kolonien mit einander verschwammen, und sehr zeitig Verflüssigung der Platten eintrat. Bei einer Anzahl von Platten ergaben sich daher Zahlen, die nur bedingten Anspruch auf Richtigkeit machen. Sie wurden in den Tabellen mit einem Fragezeichen versehen. Trotzdem giebt dieser Versuch noch einen brauchbaren Ueberblick über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Keime in den Lösungen während der ersten 24 h.

Versuch 4. Prüfung des Wachstums der Cholerakeime in Fleischwasser verschiedener Alkalinität. Neutralisation des sauren Fleischwassers mit 3,5 cc % Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion. Zur weiteren Alkalisierung wurde Soda benutzt. Der Alkaligehalt des vorhandenen wasserhaltigen kohlensauren Natron (Natrium carbonicum siccum = $Na_2 CO_3 + 2 H_2 O$) wurde titrimetrisch mit $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure und Dimethylorange als Indikator festgestellt. 1 Gramm des

vorhandenen Soda enthielt 0,279 g Alkali auf NaOH berechnet. Um Fleischwasserlösungen von 0,1%, 0,2%, 0,3% und 0,4% Alkalizusatz zu erhalten, mussten demnach zu je 100 cc neutralen Fleischwassers 0,358 gr, 0,716 gr, 1,074 gr und 1,432 gr des vorhandenen kohlensauren Natron gegeben werden. Je 40 cc dieser 4 Lösungen kamen in die Tropfgläser 1 bis 4 und wurden darin 20 Min. im strömenden Dampfe sterilisiert.

Im übrigen gestaltete sich der Versuch wie die vorigen. 1 Oese 24 h alter Choleragelatinestichkultur wurde in 25 cc Verdünnungsflüssigkeit aufgeschwemmt, und von dieser Suspension je 5 Tropfen in die Gläser 1 bis 4 gegeben. Leider waren die zur Keimbestimmung des Originales gegossenen Platten nach 24 h schon verflüssigt. Aus jedem Tropfglas wurden zur Anfangskeimbestimmung mit je 5 Tropfen Platten gegossen, und die Gläser dann bei 25° C gehalten. Keimzählungen wurden nach 3 h, 6 h und 24 h vorgenommen. Die Resultate finden sich in den Versuchstabellen.

Versuch 5. Dieser Versuch fällt etwas aus dem Bereiche der gestellten Aufgabe heraus. Er wurde unternommen, um die Vermehrungsgeschwindigkeit der Cholerakeime in einigen der übrigen flüssigen Nährmedien zu prüfen, vor allem um den Einfluss festzustellen, den Pepton, Kochsalz und Alkali in wässrigen Lösungen im Vergleich zum Wachstum im Fleischwasser ausüben.

Als Nährböden dienten je 40 cc folgender Lösungen:

Tropfglas 1: Fleischwasser neutral für Phenolphthalein. Neutralisation des sauren Fleischwassers mit 3,6 cc % Normalnatronlauge.

Tropfglas 2: Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,1% Alkalizusatz. Wie beim 4. Versuch wurde dem mit Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion neutralisierten sauren Fleischwassers Soda zugesetzt. 1 Gramm des vor-

handenen Natrium carbonicum siccum enthielt nach Titrierung mit Zehntelnormalschwefelsäure und Dimethylorange als Indikator 0,7 gr Alkali auf Na OH berechnet. Um demnach einen Zusatz von 0,1% Alkali zu erhalten, mussten zu 100 cc neutralisierten Fleischwassers 0,143 gr Soda gegeben werden.

Tropfglas 3: 2%iges Peptonwasser mit Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion neutralisiert mit 0,5% Kochsalzzusatz. In 400 cc destilliertem Wasser wurden 8 gr peptonum siccum-Witte-Rostock gelöst, die Lösung 1 h lang im strömenden Dampfe sterilisiert und im Heisswassertrichter filtriert. Auf 100 cc Filtrat wurde 0,5 gr Kochsalz gegeben, und diese Lösung mit einigen Tropfen Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion neutralisiert.

Tropfglas 4: 2%iges Peptonwasser mit Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion neutralisiert ohne Zusatz von Kochsalz.

Tropfglas 5: 2%iges Peptonwasser neutral mit 0,1% Alkalizusatz. Zur Verwendung kam dasselbe Soda wie bei Tropfglas 2.

Sämtliche Tropfgläser wurden mit ihrem Inhalt 20 Min. im strömenden Dampfe sterilisiert.

Um mit nicht zu grossen Anfangskeimmengen zu arbeiten, wurden aus der in der gewöhnlichen Weise mit 1 Oese 24 h alter Choleragelatinestichkultur hergestellten Originalaufschwemmung erst 8 Tropfen in einem 2. Tropfglas (Original 2) aufgeschwemmt. Der Keimgehalt dieses 2. Originales wurde bestimmt, und aus diesem Original je 5 Tropfen in die Gläser 1 bis 5 gegeben. Der Keimgehalt des 2. Originals betrug für 5 Tropfen nach 4 Kontrollbestimmungen (Okular 1, Objektiv 3, 30 Gesichtsfelder) 24 300, 24 000, 32 900 und 29 800 Keime. Die Zahl der in die 5 Gläser gegebenen Keime berechnete sich hieraus für 1 Gramm Nährlösung auf 600, 600, 800 und

700, im Mittel also auf 700 Keime. Die direkte Anfangskeimbestimmung ergab folgende Zahlen (Lupenzählung):

Tropfglas	α	β	Mittel
1	590	500	550
2	360	530	450
3	300	290	300
4	170	200	190
5	160	150	160

Keimzählungen wurden weiter nach 3 h, 6 h, 9 h, 12 h und 2 d gemacht. Bei den letzten beiden Gläsern erwiesen sich die gewählten Verdünnungen als zu gross. Die Keimzahlen erscheinen daher zu klein. Manche Platten werden nur aus dem Grunde steril geblieben sein, weil in den 5 Tropfen der grossen Verdünnung halber zufällig kein Keim vorhanden war. Doch sind die Unterschiede der Keimzahlen in den 5 Gläsern so ausgesprochen, dass man ohne Bedenken daraus Schlussfolgerungen ziehen darf.

Die Keimzahlen finden sich in den Versuchstabellen.

3. Litteratur.

Schon in dem Bericht über die Thätigkeit der zu der Erforschung der Cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission[1]) finden sich Angaben über die Abhängigkeit der Choleravibrionen von der Reaktion des Nährbodens. „Bei den Züchtungen stellte sich unter anderem heraus, „dass die Nährsubstanzen, wenigstens die Nährgelatine und „die Fleischbrühe, durchaus nicht sauer sein dürfen. Sobald „die Nährgelatine auch nur eine Spur von saurer Reaktion „zeigte, war das Wachstum der Kommabacillen schon ein kaum „merkbares. War die Reaktion deutlich sauer, dann hörte die „Entwicklung der Bacillen vollkommen auf. Dass indess nicht

[1]) Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt. 1887. Band III. S. 164.

„alle Säuren diesen nachteiligen Einfluss ausüben, ergab sich „daraus, dass die Cholerabacillen auf den ebenfalls sauer rea„gierenden Schnittflächen gekochter Kartoffeln recht üppig ge„diehen.“ Diesen Worten fügt Koch in seinem Bericht aus „Kalkutta vom 2. II. 1884[1]) noch hinzu: „Es hat sich ferner „noch ergeben, dass ihr Wachstum nur in alkalisch reagierenden „Nährsubstanzen regelrecht erfolgt. Schon eine sehr geringe „Menge freier Säure, welche das Wachstum andrer Bakterien „noch nicht merklich beeinflusst, hält sie in der Entwicklung „auffallend zurück.“ Alle späteren Arbeiten haben diese Sätze nur bestätigen und im Einzelnen weiter ausbauen können. Im folgenden sollen von den bekannt gewordenen Thatsachen nur die für die gewählte Versuchsanordnung wichtigen angeführt werden.

Kitasato[2]) neutralisierte das saure Fleischwasser mit einer 5,3 gr Soda, das durch Glühen von reinem gepulverten Natrium bicarbonicum erhalten war, im Liter enthaltenden Lösung, von der er 20—22cc auf 100cc Fleischwasser verbrauchte. Zur Neutralisation von 100cc Fleischwassergelatine brauchte er 3—3,5cc einer 10%igen Lösung wasserfreien Natriumkarbonates. Er prüfte nun das Wachstum der Cholerakeime, indem er den auf diese Weise gewonnenen Nährböden Lösungen einer Reihe von Säuren und Alkalien zusetzte und dann mit Cholerakultur impfte. So wuchsen z. B. bei Zusatz von 0,225% Milchsäure zu einer neutralen Bouillon noch 3—5 Cholerakolonien. Bei Zusatz von 0,43—0,27% wurden die Cholerabacillen in einer Rollplatte vernichtet. In der nicht neutralisierten sauren Fleischwassergelatine kamen die Cholerakeime nicht zur Entwicklung. Ebenso war das Verhalten in

[1]) l. c. S. 26*.

[2]) Kitasato, Ueber das Verhalten der Typhus- und Cholerabacillen zu säure- und alkalihaltigen Nährböden. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1888, Band III. S. 404.

saurer Bouillon. Kitasato stellte ferner fest, dass das Wachstum der Cholerakeime in den sauren Nährböden sehr abhängig von der Temperatur ist. Bei Brüttemperatur (34—36° C) vermochten die Keime einen viel grösseren Säurezusatz zu neutralem Agarnährboden zu vertragen als bei Zimmertemperatur. Was das Verhalten zu Alkalien anbetraf, so wuchsen noch einige Cholerakolonien bei Zusatz von 0,18% KOH bezüglich NaOH zu neutraler Bouillon. Bei Zusatz von 0,2—0,23% trat kein Wachstum mehr ein. Bei Zusatz von 2,47% Na_2CO_3 wuchsen noch einige Kolonien, bei Zusatz von 2,72—3,45% keine mehr.

Nach Dahmen[1]) ist zur Untersuchung der Fäces auf Cholerabacillen eine Gelatine mit 1% Soda die geeignetste. Ein schwach alkalischer Nährboden ist zu dieser Untersuchung nach seiner Ansicht absolut ungeeignet. Nach Stutzer und Burri[2]) wurde von den Cholerakeimen recht gut ein Gehalt der Gelatine von 0,4—0,5% Na_2CO_3 vertragen. In fast neutraler Gelatine blieb das Wachstum der Kolonien äusserst kümmerlich. Sie schliessen daraus, dass in neutralen Flüssigkeiten das Wachstum der Cholerakeime bereits gehindert wird. Von ihren Versuchen über das Verhalten der Choleravibrionen gegen stark verdünnte Phosphorsäure beobachteten sie noch bei 24h Einwirkung sehr zahlreiche Kolonien.

Hesse[3]) prüfte den Einfluss der Alkaleszenz des Nährbodens auf das Wachstum der Bakterien, unter ihnen auch der

---

[1]) Dahmen, Die Nährgelatine als Ursache des negativen Befundes bei Untersuchung der Fäces auf Cholerabacillen. Centralblatt für Bakterien und Parasitenkunde 1892, Band XII, S. 620.

[2]) Stutzer und Burri, Untersuchungen über die Bakterien der Cholera asiatica. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1893, Band XIV. S. 15.

[3]) Hesse, Ueber den Einfluss der Alkaleszenz des Nährbodens auf das Wachstum der Bakterien. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1893, Band XV. S. 183.

Cholerakeime, indem er auf gasanalytischem Wege den von den Kolonien verbrauchten O und die erzeugte CO_2 berechnete. Er setzte zu 25cc Nähragaragar verschiedene Mengen einer Normallösung von krystallisiertem kohlensauren Natron zu. Ein Glas liess er ohne Zusatz. Am günstigsten erwies sich ein Zusatz von 0,01—0,023% krystallisiertem kohlensauren Natron. In dem Glase, das keinen Alkalizusatz erhalten hatte und schwach sauer reagierte, kam der Bacillus überhaupt nicht zur Entwicklung, ging vielmehr binnen Kurzem zu grunde.

Nach Flügge[1]) erhält man die günstigste Alkaleszenz wenn man zu einem Liter Bouillon 35cc, zu einem Liter Nährgelatine 55cc einer Sodalösung zufügt, welche 10,6% durch Glühen von Natriumkarbonat hergestellte Soda enthält.

Gruber[2]) alkalisiert seine nach Vorschrift von Petri und Maassen bereitete 10%ige Nährgelatine bis zum Eintritt der Rosolsäurereaktion. Nach seiner Beobachtung erscheinen die Choleravibrionen in solcher Gelatine charakteristischer als bei stärkeren Alkaleszenzgraden.

Winkler[3]) beobachtete nach einer unter Anleitung von Lehmann entstandenen Arbeit fast gleich üppiges Wachstum der Cholerakeime auf phenolphthaleinneutralem Agar oder, wenn er diesem auf 1 Liter 10cc Normalnatronlauge oder 10—20cc Normalschwefelsäure zusetzte. Bei Zusatz von 30cc Normalschwefelsäure trat kein Wachstum mehr ein.

Eingehendere Untersuchungen über die Einwirkung der phosphorsauren Salze auf die Cholerakeime stellten Stutzer und Burri

[1]) Flügge, Die Verbreitungsweise und Verhütung der Cholera etc. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1893. Band XIV. S. 122.

[2]) Gruber, Bakteriologische Diagnostik der Cholera und des Choleravibrio. Archiv für Hygiene. 1894, Band XX. S. 140.

[3]) S. Winkler. Ueber den Einfluss der Reaktion der Nährböden auf die Entwicklung der Bakterien. Dissertation. Würzburg 1896.

an[1]). Sie beobachteten, dass eine 0,04%ige Lösung freier Phosphorsäure erst nach 24h Einwirkung keimtötend auf die Cholera wirkt. Eine 0,07%ige Lösung wurde 1/4h lang ohne Schaden vertragen. Nach 1h Einwirkung trat Keimtötung ein. Eine 0,06%ige Lösung von einbasisch-phosphorsaurem Kalk wirkte nach 24h keimtötend. Eine 0,09%ige Lösung wurde 1/4h lang ohne Schaden vertragen. Eine Lösung, die 7,5% zweibasisch-phosphorsauren Kalk enthält, wirkte auch nach 24h noch nicht keimtötend. Stutzer und Burri hoben hervor, dass die angegebene keimtötende Wirkung der Phosphorsäure vielleicht durch die saure Beschaffenheit der beiden ersten Lösungen bedingt werde. Mischten sie ein nicht saures Phosphat, nämlich das schwach alkalisch reagierende Natriumphosphat Na_2HPO_4, in wässriger Lösung mit einer Cholerapeptonkultur, so dass dieselbe eine 0,15% H_3PO_4 entsprechende Menge von Phosphorsäure enthielt, so erwies sich das Natriumphosphat selbst bei 24h Einwirkung als völlig wirkungslos.

Deelemann[2]) ging bei seinen Untersuchungen von auf den Lackmusblauneutralpunkt eingestellten Nährböden, Gelatine und Agar, aus. Für den Cholervibrio erwies sich ein Sodazusatz wesentlich günstiger als Aetznatron. Bei Sodazusatz vermehrten sich die Keime schneller als auf neutralen Nährböden. Bei Aetznatronzusatz war der Unterschied nicht so gross. Das Wachstum wurde bei 5,1cc% Normalnatronlauge aufgehoben, während es bei Sodazusatz selbst bei 15,6cc% Normalnatronlauge noch nicht ganz erloschen war. Das beste Wachstum fand sich bei 1,95cc% Normalsodalauge und 1,7cc% Normal-

---

[1]) Stutzer und Burri, Untersuchungen über die Einwirkungen von Torfmull, sowohl bei alleiniger Anwendung desselben, wie auch mit Beigabe gewisser Zusätze auf die Abtötung der Cholerabakterien. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1893. Band XIV. S. 457.

[2]) Deelemann, l. c. S. 395.

natronlauge. Bei einer anderen Kultur fiel es auf 0,78 cc% Normalsodalauge und 0,68 cc% Normalnatronlauge. Für Aetznatron war innerhalb der Grenze zwischen der neutralen Probe und der mit 3,4 cc% Normalnatronlauge kein nennenswerter Unterschied.

Die über unseren Gegenstand in der Litteratur niedergelegten Thatsachen lassen sich kurz in folgende Sätze zusammenfassen: Ein regelrechtes Wachstum der Choleravibrionen erfolgt nur in schwachalkalischen Nährböden. Der Grad der optimalen Alkalinität wird sehr verschieden angegeben. Nach dem jetzigen Standpunkte wird man wohl annehmen müssen, dass derselbe bei den einzelnen geprüften Kulturstämmen nicht konstant bleibt, sondern je nach Temperatur, chemischer Zusammensetzung des Nährmediums, Alter der Kultur u. s. w. sich ändert. Nach mehrfachen Angaben soll das Wachstum der Cholerakeime schon in neutralen Nährböden gehemmt werden. Saure Reaktion wird von ihnen gar nicht vertragen. Kitasato brachte die Keime in saurer Bouillon nicht zur Entwicklung. Wie nachfolgende Untersuchungen lehren, verhalten sich auch in dieser Beziehung die einzelnen Stämme verschieden. Bei der von mir verwendeten Kultur liess sich im sauren Fleischwasser eine nicht unbedeutende Vermehrung der Cholervibrionen feststellen.

4. Das Verhalten der Cholerakeime beim Uebergang aus einem festen Nährboden in flüssige Nährsubstrate verschiedener Reaktion.

Bei sämtlichen Versuchen wurden die Cholerakeime der Gelatine entnommen, in einer für sie nahezu indifferenten Lösung aufgeschwemmt und dann in Fleischwassernährböden verschiedener Reaktion ausgesät. Durch die quantitativen Keimbe-

stimmungen konnte die Zahl der aus der Originalaufschwemmung in die Nährlösungen gegebenen sowie die Zahl der sich darin wiederfindenden Keime ermittelt werden. Ein Vergleich dieser Zahlen musste ein Bild von der Einwirkung geben, die die Nährlösungen auf die Keime in den ersten Augenblicken ausgeübt hatten.

Die Veränderungen der Lebensbedingungen, denen bei der gewählten Versuchsanordnung die Keime unterworfen waren, sind physikalischer und chemischer Natur. Der feste Nährboden wird zu einem flüssigen. Das Wachstum in der Kolonie wird zu dem in der Suspension. Das vorher in hoher Konzentration gereichte Nährmaterial findet sich jetzt in wesentlich verdünnterer Form. Auch die chemische Zusammensetzung des Nährsubstrates ist in manchen Beziehungen anders geworden. Weitgehende Aenderungen in Bezug auf Quellungsverhältnisse und Salzgehalt müssen plötzlich im Protoplasmaleib der Keime vor sich gehen. Hierzu kommen noch unmittelbar schädigende Einflüsse. Die Keime waren bis jetzt auf einem für sie anerkanntermassen sehr günstigem Nährsubstrat, auf schwach alkalischer Gelatine, gewachsen. Jetzt werden sie in einer Anzahl von Lösungen plötzlich der Einwirkung von sauren Salzen und freier Fleischmilchsäure ausgesetzt. Als günstiges Moment kann vielleicht angeführt werden, dass die Keime in der grösseren Verdünnung für eine Zeit dem tötlichen Einflusse der Stoffwechselproduckte entzogen werden.

Die Summe dieser Einwirkungen muss sich in den bei der ersten Bestimmung gewonnenen Keimzahlen ausprägen. Nicht alle Bakterien werden imstande sein sich diesen neuen Lebensbedingungen anzupassen. Eine nicht unbeträchliche Zahl von Individuen geht zugrunde oder wird wenigstens so geschwächt, dass sie auf Gelatine übertragen dort nicht zu Kolonien auszuwachsen vermag. Bei den ersten Keimbestimmungen

werden daher Zahlen auftreten, die die Höhe der Aussaat nicht erreichen. Die von den gekennzeichneten Aenderungen in den Aussenbedingungen herrührenden Einflüsse auf die Keime werden sich in einer nahezu gleichmässigen Verminderung der Bakterienzahl ausprägen. Eine regelrechte Abstufung der Keimzahlen jedoch vom neutralen Fleischwasser zum sauren in den sich nur durch die Azidität unterscheidenden Lösungen kann nur auf Rechnung der Reaktion des Nährbodens gesetzt werden. Die allgemeinen Aenderungen der Aussenbedingungen also auf der einen Seite und besonders wiederum die Reaktion des neuen Nährsubstrates auf der anderen sind Momente, die in der Folge wohl auseinander zu halten sind.

Prüft man nun die zu Beginn der Versuche in den Gläsern vorhandenen Keimzahlen nach dieser Richtung hin, so lassen sich beide Einflüsse deutlich nachweisen.

Zunächst soll hervorgehoben werden, dass die Anfangskeimbestimmungen unmittelbar nach der Aussaat aus der Originalaufschwemmung in die Tropfgläser gemacht worden waren. Die Keime unterlagen also der Einwirkung der Nährlösungen nur wenige Augenblicke. Eine Ausnahme macht der erste Versuch, bei dem erst aus den 4 Originalen die Aussaat in die 4 Gläser gemacht, und dann vom ersten Glas angefangen die Keimbestimmungen vorgenommen wurden. Infolgedessen verblieben die Keime im sauren Fleischwasser etwas länger als in den zuerst vorgenommenen Gläsern, die mit Fleischwasser und Alkalizusätzen beschickt waren. Bei diesem Versuche macht sich gleich bei der ersten Keimbestimmung der Einfluss der Reaktion der Nährlösungen geltend. Die Zahlen fallen in scharfer Kurve vom neutralen Fleischwasser zum sauren (Tab. 1. Vers. 1). Während bei der phenolphthaleinneutralen Bouillon keine Keimverringerung eingetreten ist, finden sich im Fleisch-

wasser von der Azidität 0,725 cc % Normalnatronlauge nur noch 92 %, im sauren Fleischwasser von 4 mal so hoher Azidität nur 49 % der ausgesäten Keime wieder. Das natürlich saure Fleischwasser wirkte also bei einer Aussaat von 18300 Cholerakeimen binnen wenigen Minuten derartig schädlich auf dieselben ein, dass nur die Hälfte von ihnen in Gelatine zu Kolonien auszuwachsen vermochte. Nur diese Keime konnten sich also den neuen Lebensbedingungen anpassen. Nur sie waren imstande neue Generationen zu erzeugen. Die neutralen Fleischwasserlösungen schienen die Keime konserviert zu haben. Während der ersten 3 h änderten sich die Verhältnisse nicht; die Keimzahlen blieben ungefähr konstant. Nach 9 h war in sämtlichen Lösungen die Vermehrung schon im lebhaften Gange.

Wesentlich anders verhalten sich die Keimzahlen des 2. und 3. Versuches. Während sich beim 2. Versuch von den ausgesäten Keimen nur 60—70 % wiederfanden, ergab beim 3. Versuch die erste Keimbestimmung höhere Zahlen. Da in den wenigen Augenblicken keine Keimvermehrung eingetreten sein konnte, so war die Zahl der ausgesäten Keime wohl etwas zu niedrig getroffen. Der Schluss ist aber berechtigt, dass eine wesentliche Keimverringerung beim 3. Versuch nicht eingetreten sein konnte. Beide Versuche treten dadurch in scharfen Gegensatz zum ersten, dass durch die Anfangskeimbestimmung bei ihnen ein Einfluss der Reaktion nicht nachgewiesen werden kann. Die Erklärung dieser Thatsache ist wohl zum Teil in der oben angeführten abweichenden Anordnung beim ersten Versuche zu finden. Nach 3 h ist beim 2. Versuche der Einfluss der Reaktion angedeutet, eine geringe Keimvermehrung nur in der phenolphthaleinneutralen und der ihr nahestehenden von 0,65 cc % Normalnatronlauge Azidität festzustellen. Nach 6stündigem Verweilen der Keime in den Lösungen ist neben ziemlicher Vermehrung ein deutlicher Einfluss der Reaktion

Tabelle 1. Versuche 1—3.

Tropfglas u. Azidität	Aussaat	Keimgeh. zu Beginn	Wieviel Keime v. 100 im Anfang vorhand.?	Keimgeh. nach 3 h.	Wieviel Keime v. 100 n. 3 h. noch vorhand.?	Keimgeh. nach 6 h.	Wieviel Keime v. 100 nach 6 h. vorhand.?
Versuch 1.							
I. Neutr. f. Phenolphth.	18 300	19 400	106%	18 600	102%		
II. 0,725 cc % Norm. NaOH	18 300	16 800	92%	15 300	84%		
III. 2,175 cc % „	18 300	12 000	62%	7800	43%		
IV. 2,9 cc % „	18 300	8900	49%	8900	49%		
Versuch 2.							
I. Neutral für Phenol-	4600	3100	67%	—	—	18 500	402%
1 phthalein	4600	2800	61%	4100	96%	26 000	565%
II. 0,65 cc % Norm.	4600	2800	61%	4100	89%	14 000	304%
2 NaOH	4600	2800	61%	3200	70%	16 000	348%
III. 1,95 cc % Norm.	4600	3300	72%	3000	65%	13 000	283%
3 NaOH	4600	2900	63%	3200	70%	8000	174%
IV. 2,6 cc % Norm.	4600	3400	74%	1700	37%	8700	189%
4 NaOH	4600	2500	54%	3500	76%	7200	157%
Versuch 3.							
I. Neutr. f. Phenolphth.	1800	2000	111%	6000	333%		
II. 1,5 cc % Norm.	1800	1700	94%	10 500	583%		
2 NaOH	1800	1900	106%	—	--		
III. 3,0 cc % Norm.	1800	2200	122%	8000	444%		
3 NaOH	1800	2000	111%	—	—		
IV. 4,5 cc % Norm.	1800	2100	117%	—	—		
4 NaOH	1800	2100	117%	4500	250%		

vorhanden. Beim 3. Versuch sind Vermehrung und Einfluss der Azidität schon nach 3h ausgesprochen.

Die aus diesen Versuchen gemachten Erfahrungen kann man in dem Satz zusammenfassen, dass die Cholerakeime bei den gewählten kleinen Aziditätsschwankungen erst einen gewissen in verschiedenen Grenzen schwankenden Zeitabschnitt in den Nährlösungen weilen mussten, ehe die Einwirkung der Reaktion hervortrat.

Dieser Zeitraum schwankte zwischen wenigen Minuten und 6 Stunden. Kam die Reaktion zur Einwirkung, so sanken die Keimzahlen parallel dem Steigen der Azidität vom neutralen zum sauren Fleischwasser.

Einer besonderen Erörterung bedürfen noch die Beziehungen zwischen Azidität des Nährbodens und dem Einsetzen der Vermehrung der Keime. Auffällig muss die starke Verminderung erscheinen, die die Bakterien im Gegensatz zum 3. Versuch in den ersten beiden beim Uebergang in die Nährlösungen erleiden. Während ferner beim 3. Versuch in den ersten 3 h je nach der Reaktion der Lösungen eine Keimvermehrung ums doppelte bis 6fache eingetreten ist ist nach dieser Zeit beim 1. Versuch noch eine weiter gegangene Verringerung, beim 2. nur eine ganz geringfügige Vermehrung zu konstatieren. In keinem der beiden Fälle werden aber nach 3 h die Keimzahlen der Aussaat erreicht. Eine Vermehrung von Bakterien zeigt an, dass sich die Keime im Vollbesitz ihrer Lebenskräfte befinden Kommt es zu einer solchen, so müssen sie sich einem ihnen zunächst ungünstigen Nährboden völlig angepasst haben. Dieser Punkt ist bei den ersten beiden Versuchen erst nach 3—6 h in den Lösungen ohne Rücksicht auf die Reaktion erreicht, während beim 3. Versuch die Keimvermehrung sofort nach Uebergang der Vibrionen in die Lösungen einsetzt. Es liegt nahe eine Erklärung dieser Thatsache in den verschiedenen Mengen der in die Gläser ausgesäten Keime zu suchen. Während beim 1. Versuch auf 1 gr. Fleischwasser 18300, beim 2. 4600 Keime kommen, finden sich beim 3. nur 1800 Keime. Lässt man den Einfluss der Reaktion ausser acht und berücksichtigt man nun die Menge des den Keimen gebotenen Nährmateriales, so sind die Bedingungen für die Bakterien des 3. Versuches viel günstiger, wenn man es in Zahlen ausdrücken will, 10 mal so günstig wie beim ersten. Ferner ist hervorzuheben, dass mit einer

grösseren Keimaussaat auch eine grössere Menge fertig gebildeter, giftiger Stoffwechselprodukte in die Nährlösungen gelangt. Unter diesen Verhältnissen haben auch die hohen Aziditäten der sauren Fleischwasserlösungen des 3. Versuchs eine im Verhältnis zu den ersten beiden Versuchen rasch einsetzende Keimvermehrung nicht zu hindern vermocht.

In den Versuchen konnte bei einer hohen Aussaat eine gewisse Zahl von Bakterien sich den neuen flüssigen Nährböden nicht anpassen. Den Rest der Keime bildeten jene lebenskräftigen Individuen, von denen dann eine um so gesteigertere Vermehrung ausging. Die Menge der unter den neuen Lebensbedingungen zugrundegegangenen oder wenigstens stark geschwächten Bakterien erschien wie erwähnt abhängig von der Zahl der ausgesäten Keime. Das umgekehrte Verhalten der Choleravibrionen konstatierte Ficker beim Uebergang in Lösungen, die an sich keinen Nährboden darstellten, wie destilliertes Wasser und physiologische Kochsalzlösung. Bei letzterer stellte er fest, dass der Grad der bakterienvernichtenden Wirkung der Lösung in einigen seiner Beispiele ganz und gar von der Menge der eingesäten Keime bezüglich der Menge des mit denselben eingeführten Nährmaterials abhing. Eine Aufschwemmung, in welcher auf die Kubikeinheit mehr Organismen trafen, wirkte auf die Keime günstiger als eine grössere Verdünnung. Da in meinen Versuchen immer von den Originalaufschwemmungen in der gleichen sich indifferent verhaltenden Lösung ausgegangen wurde, andererseits auch in den bakterienungünstigen sauren Fleischwasserlösungen sich noch Nährstoffe in Hülle und Fülle befanden, konnten derartig kleine Schwankungen im Nährmaterial, wie sie für die Versuche Fickers von weitgehender Wirkung waren, nicht in Betracht kommen.

Als wichtige Folgerung ergiebt sich die Thatsache, dass

bei verschieden grossen Aussaaten die nach späteren Bestimmungen erhaltenen Keimzahlen nicht ohne Weiteres miteinander vergleichbar sind.

5. Die Vermehrung der Cholerakeime in flüssigen Nährböden verschiedener Reaktion während der ersten 24 Stunden.

Um eine Uebersicht über die Vermehrung der Cholerakeime in den geprüften Nährlösungen zu erhalten, wurden die Keimzahlen der ersten drei Versuche zu einer Tabelle zusammengestellt, in der die erhaltenen Keimmengen nach der Azidität der Lösungen geordnet erschienen (Tab. 3). Die Zahlen sind zurückgerechnet auf die durch die erste Bestimmung gewonnenen Keimmengen. Diese sind = 1 gesetzt.

Wie schon hervorgehoben, ist der Einfluss nicht zu unterschätzen, den die Zahl der ausgesäten Keime auf die Vermehrungsintensität ausübt. Betrachtet man z. B. die in den neutralen Lösungen nach 24h erreichten Keimzahlen, so sieht man, dass dieselben in ihrer Höhe sich ungefähr umgekehrt propor-

Tabelle 2. Versuche 1—3.

Keimzahlen zu Beginn	Keimzahlen n. 24h auf die Anfangskeimzahlen als Einheit berechnet.	Azidität	Versuch
1700	429 000	1.5 cc % Norm. Na O H	3 Tr. Gl. II.
1900	294 000	1,5 cc % „	3 Tr. Gl. 2.
2000	200 000	3,0 cc % „	3 Tr. Gl. 3.
2200	197 000	3,0 cc % „	3 Tr. Gl. III.
2800	140 000	0,65 cc % „	2 Tr. Gl. 2.
3100	102 000	neutral	2 Tr. Gl. I.
3400	75 000	2,6 cc % Norm. Na O H	2 Tr. Gl. IV.
8900	40 000	2,9 cc % „	1 Tr. Gl. IV.
19400	38 000	neutral	1 Tr. Gl. I.

tional den Zahlen der ausgesäten Keime verhalten. Je mehr Bakterien zur Aussaat gelangten, um so weniger ausgiebig war die Vermehrung. Noch deutlicher lässt sich

Tabelle 3. Versuch 1—3.

Keimzahl zu Beginn	19400	3100	2800	2000	2800	2800	16900
Azidität	neutral	neutral	neutral	neutral	0,65 cc %	0,65 cc %	0,725 cc %
Versuch	1 Tr. Gl. I	2 Tr. Gl. I	2 Tr. Gl. 1	3 Tr. Gl. I	2 Tr. Gl. II	2 Tr. Gl. 2	1 Tr. Gl. II
Zu Beginn	1	1	1	1	1	1	1
nach 3 h	0,96	—	1,58	3	1,50	1,1	0,91
„ 6 h	—	6	9	8	5	6	—
„ 9 h	99	67	104	—	50	76	182
„ 24 h	38 000	102 000	189 000	220 000	96 000	140 000	57000

Keimzahl zu Beginn	1700	1900	3300	2900	12 000	3400	2500
Azidität	1,5 cc %	1,5 cc %	1,95 cc %	1,95 cc %	2,175 cc %	2,6 cc %	2,6 cc %
Versuch	3 Tr. Gl. II	3 Tr. Gl. 2	2 T. G. III	2 Tr. Gl. 3	1 T. G. III	2 T. G. IV	2 Tr. Gl 4
Zu Beginn	1	1	1	1	1	1	1
nach 3 h	6,18	—	1,91	1,10	0,65	0,50	1,40
„ 6 h	113	111	3,9	2,8	—	2,6	2,9
„ 9 h	4000 ?	2400	24	30	36	11	12
„ 24 h	429 000	294 000	—	93 000	74 000	75 000	78 000

Keimzahl zu Beginn	8900	2200	2200	2100	2100
Azidität	2,9 cc %	3,0 cc %	3,0 cc %	4,5 cc %	4,5 cc %
Versuch	1 Tr. Gl. IV	3 Tr. Gl. III	3 Tr. Gl. 3	3 Tr. Gl. 4	3 Tr. Gl. IV
Zu Beginn	1	1	1	1	1
nach 3 h	1	3,63	—	—	2,14
„ 6 h	—	55	62	10	16
„ 9 h	35	167	—	53	57
„ 24 h	40 000	197 000	200 000	74 000	98 000

dies Gesetz vor Augen führen, wenn man ohne Rücksicht auf die Azidität der Nährlösungen die erreichten Keimmengen nach der Höhe der Aussaat ordnet. (Tab. 2).

Wenn man nach einer Erklärung dieser Thatsache forscht, so könnte man daran denken, dass bei reicherer Aussaat einem Keime weniger Nährmaterial zur Verfügung steht als bei spärlicherer Aussäung der Bakterien. Dies Moment kann aber bei vorliegenden Versuchen nicht in Betracht kommen. Auch in den sauren Lösungen ist das Nährmaterial im Verhältnis zum Bedarf der Keime so ausserordentlich gross, dass auch bei reichster Aussaat in 24h ein Nahrungsmangel nicht auftreten kann. Die Ursache der erwähnten Erscheinung muss vielmehr in den von den Bakterien gebildeten Stoffwechselprodukten gesucht werden. Je grösser die Aussaat um so mehr fertig gebildeter Stoffwechselprodukte müssen mit in die Nährlösungen gelangen, um so eher tritt dann, wenn die Keime in den Nährmedien durch ihren Lebensprozesse wieder Gifte erzeugt haben, ihre verderbliche entwicklungshemmende Wirksamkeit auf. Die in Tabelle 2 gegebenen Zahlen lehren, dass dieser Einfluss der ausgesäten Keimzahl den der Reaktion wenigstens bei den gewählten kleinen Schwankungen der Azidität manchmal bedeutend überwiegt. So werden bei einer Aussaat von 19400 Keimen aus 1 Keim in 24h deren 38000, wenn das Fleischwasser neutral für Phenolphthalein ist, bei einer Aussaat von nur 2200 Keimen aber 197000 Keime, auch wenn das Fleischwasser eine Azidität von 3,0cc% Normalnatronlauge besitzt.

Dieser Thatsache muss also Rechnung getragen werden, wenn man durch Vergleichung der Zahlen aus den Versuchen Schlüsse auf die Einwirkung der Reaktion ziehen will. Es dürfen nur Zahlenreihen von nahezu gleichen Aussaatmengen mit einander verglichen werden.

Bei einer Würdigung des ersten Versuches kommen die Einflüsse der Aussaatmenge zwar stark in Betracht, vermögen aber die weitgehende Wirkung der Reaktion des Nährbodens auf die Entwicklung der Keime bei weitem nicht zu unter-

drücken. Die schnellste Vermehrung scheint in dem der phenolphthaleinneutralen Bouillon nahestehendem Fleischwasser von 0,725 cc % Normalnatronlauge stattgefunden zu haben (Tab. 4 und 5). Vielleicht ist zu berücksichtigen, dass innerhalb der ersten 3 h im Vergleich zur phenolphthaleinneutralen Bouillon in diesem Nährboden eine kleine Verminderung der ausgesäten Keime stattgefunden hat, dass also die Vermehrung unter an sich ganz günstigen Verhältnissen von einer geringeren Keimmenge ausgeht (15300 : 18500 Keime). Diese gewissermassen im Kampfe ums Dasein kräftig gewordenen Keime sind aber, wie nachgewiesen werden wird, imstande sich besonders lebhaft zu vermehren. Dennoch werden schliesslich im Verlaufe des Versuchs in der phenolphthaleinneutralen Bouillon höhere absolute Keimwerte erreicht als im Fleischwasser von 0,725 cc % Normalnatronlauge Azidität.

Tabelle 4. Versuch 1.

Keimzahlen	neutral	0,725 cc % N. NaOH	2,175 cc % N. NaOH	2.9 cc % N. NaOH
Aussaat	18300	18300	18300	18300
Zu Beginn	19400	16900	12000	8900
nach 3 h	18600	15300	7800	8900
„ 9 h	1,9 M.[1])	3,1 M.	426000	315000
„ 24 h	739 M.	962 M.	892 M.	357 M.

Die Zahlen der Tabelle 5 sind auf eine später zu schildernde Weise berechnet worden. Sie geben an, wie viel Generationen die Keime in den verschiedenen Lösungen in der Zeit von der 3. bis 9. und 9. bis 24 h gebildet haben, sowie die Zeiten, die zur Bildung einer neuen Generation nötig gewesen sind. Es ist dabei von der nicht ganz richtigen An-

[1]) M. = Millionen.

Tabelle 5. Versuch 1.

	neutral	0,725 cc % N. NaOH	2,175 cc % N. NaOH	2,9 cc % N. NaOH
Generationen von d. 3.—9. h	7	8	6	5
Dauer einer Generationsbildung in diesen 6 h	51 min	45 min	1 h	1 h 12 min
Generationen von d. 9.—24. h	9	8	11	10
Dauer einer Generationsbildung in diesen 15 h	1 h 40 min	1 h 53 min	1 h 22 min	1 h 30 min

nahme ausgegangen worden, dass die Vermehrung der Keime gleichmässig vor sich ginge. Aus Tabelle 4 und 5 lässt sich der Beweiss führen, dass beim 1. Versuche der keimtötende Einfluss der höheren Aziditäten nur während der ersten 3h anhält. In den nächsten 6h wirkt die Azidität der betreffenden Lösungen nur vermehrungshemmend, in den weiteren nächsten 15h dagegen entwicklungsfördernd. Die Cholerakeime in den sauren Lösungen, die der Einwirkung der Reaktion Trotz geboten haben, sind dann sogar befähigt sich schneller zu vermehren als die in den günstigen Nährmedien befindlichen Keime. Es bestätigt sich hier dasselbe Gesetz, das Ficker fürs Verhalten der Cholerakeime im destillierten Wasser ausspricht, wenn er sagt: „In der That zeigen die Organismen „bei allen den hier in Frage kommenden dichten Suspensionen „die übereinstimmende merkwürdige Tendenz den zunächst er„folgten Abfall späterhin durch Erzeugung neuer Generationen „nicht nur zu kompensieren, sondern sogar über die ursprüng-

„lich eingesäte Zahl hinaus sich zu vermehren. Nur eine be-
„stimmte Anzahl und Auslese von Keimen, die den neuen Ver-
„hältnissen sich akkomodiert, bildet so den Stamm für weitere
„Generationen, für welche das neue Medium, auch wenn es
„als Stickstoffquelle vielleicht nur die zerstörte Zellsubstanz
„der toten Keime enthält, wieder lange Zeit ausreicht, den
„Lebensprozess fortzusetzen." Letztere Eventualität kommt natürlich bei vorliegenden Versuchen nicht in Betracht.

Tabelle 6. Versuch 2.

Keimzahlen	neutral		0,65cc% N. NaOH		1,95cc% N. NaOH		2,6cc% N. NaOH	
	I	1	II	2	III	3	IV	4
Aussaat	4600	4600	4600	4600	4600	4600	4600	4600
Zu Beginn	1	1	1	1	1	1	1	1
	(3100)	(2800)	(2800)	(2800)	(3300)	(2900)	(3400)	(2500)
nach 3h	—	1,58	1,46	1,46	0,91	1,1	0,5	1,4
„ 6h	6	9	5	6	3,9	2,8	2,6	2,9
„ 9h	67	104	49	76	24	30	11	12
„ 24h	102000	189000	96400	139300	—	93000	75000	78000

Der 2. Versuch bestätigt die beim ersten gemachten Erfahrungen.

Tabelle 7. Versuch 2.

	neutral	0,65 cc % N. NaOH	1,95 cc % N. NaOH	2,6 cc % N. Na OH
Generationen in d. erst. 3 h	0,7	0,5	0,03	0
Dauer ein. Generationsbldg.	4 h 17 m.	6 h	über 6 h	über 6 h
Generat. von der 3.—6. h	2,3	2	1,8	1,6
Dauer ein. Generationsbld.	1 h 18 m.	1 h 30 m.	1 h 40 m.	1 h 53 m.
Generat. von der 6.—9. h	3,5	3,4	3	2
Dauer ein. Generationsbld.	51 min.	53 m.	1 h	1 h 30 m.
Generat. von der 9.—24. h	10,7	10,8	11,8	12,7
Dauer ein. Generationsbldg.	1 h 24 m.	1 h 23 m.	1 h 16 m.	1 h 11 m.

Die höchsten absoluten Keimzahlen finden sich in einem Glase mit phenolphthaleinneutraler Bouillon nach 24h, die nächsthöchsten in dem einen Glase mit Fleischwasser von der Azidität 0,65cc% Normalnatronlauge (Tab. 6). Um ein anschauliches Bild von der Vermehrungsgeschwindigkeit der Keime in den Lösungen zu erhalten, sind wiederum die in gewissen Zeitabschnitten erzeugten Generationen und die zur Bildung einer Generation nötigen Zeiten ausgerechnet worden. Bei der hohen Uebereinstimmung der Keimzahlen in den Kontrolltropfgläsern konnte ein gröberer Fehler nicht entstehen, wenn dem Berechnungsmodus die Mittelwerte der Zahlen zu Grunde gelegt wurden.

In allen 4 Nährlösungen ist die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Keime am langsamsten während der ersten 3h. Sie fällt in dieser Zeit an Intensität von den neutralen Lösungen zu den sauren. Nach der 3.h nimmt sie rasch zu, um wenigstens bei den gemachten Keimbestimmungen ein Maximum nach 9h zu erreichen. Dann tritt allmählich eine Abnahme der Vermehrungsgeschwindigkeit ein. Die absolut rascheste Vermehrung findet sich bis zur 9.h in der phenolphthaleinneutralen Bouillon, die langsamste bis zur 3.h im sauren Fleischwasser. Dann dreht sich das Bild analog dem vorigen Versuche um, sodass im sauren Fleischwasser allmählich eine stärkere Vermehrung als im neutralen eintritt. Wiederum ist also die der sauren Reaktion sich anpassende geringere Zahl von Keimen befähigt allmählich an Fortpflanzungsintensität die Keime in den günstigen neutralen Lösungen zu übertreffen. Dabei sind die nach 24h in den sauren Lösungen erreichten absoluten Keimzahlen wesentlich kleiner als die in den neutralen. Im vorliegenden 2. Versuche finden sich z. B. nach 24h in den sauren Lösungen bei gleicher Aussaat nur halb so viel Keime als in der phenolphthaleinneutralen Bouillon.

Wie bereits im Eingang erwähnt, wurde versucht in Zahlen ausdrückbare, gesetzmässige Beziehungen zwischen den Abstufungen der Keimzahlen und denen der Aziditäten der Nährlösungen aufzufinden. Im 2. Versuche verhalten sich die Säuregrade der verwendeten Nährlösungen wie 0:1:3:4. Die bei den einzelnen Keimbestimmungen erhaltenen Zahlen verhalten sich, wenn man wieder die Mittelwerte aus je 2 Kontrollgläsern zugrundelegt und die Zahlen des natürlich sauren Fleischwassers = 1 setzt

nach 3h	wie	1,6	1,5	1 : 1
„ 6h	„	3	2	: 1,2 : 1
„ 9h	„	7	5	: 2 : 1
„ 24h	„	2	1,5	: 1,2 : 1

Bei gleicher Aussaat finden sich also z. B. nach 9h im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser 7 mal so viel Keime wie im sauren. Die Zahlen beweisen, dass das Verhältnis der Keimzahlen in den Lösungen verschiedener Azidität nicht dasselbe bleibt. Nach 9h ist die Differenz der Zahlen unter einander am grössten. Im Anfang und nach 24h Wachstum ist sie bei weitem nicht mehr so gross. Diese Thatsache giebt wieder einen Wink, dass die Wirkung der Reaktion des Nährbodens auf die Entwicklung der Keime am reinsten in der ersten Zeit, im 2. Versuch bis etwa zur 9. h, zum Ausdruck kommt. Dann sind 2 weitere Momente von Bedeutung. Die im sauren Fleischwasser wachsenden Keime gleichen durch gesteigerte Vermehrung die Zahlenunterschiede wieder aus, während in den an sich günstigen neutralen Lösungen die gebildeten Stoffwechselprodukte das Wachstum hemmen. Durch diese Einflüsse kommt es mit der Zeit zu einer Ausgleichung der Reaktionswirkung.

Die erste reine Einwirkung der Aziditäten auf die Keime lässt sich nun nicht in schematischer Weise dadurch zum Aus-

druck bringen, dass sich die gebildeten Keimmengen etwa genau umgekehrt proportional dem Säuregrade der Nährmedien verhielten. Es lässt sich nur der Satz aussprechen, dass die Keimzahlen parallel dem Steigen der Azidität des Nährbodens sinken. Der Einfluss der Azidität in den sauren Lösungen zeigt sich beim 2. Versuch darin, dass die Vermehrung der Keime in der ersten Zeit bedeutend langsamer vor sich geht als in den neutralen Lösungen, so dass sich in letzteren nach einiger Zeit viel mehr Keime finden müssen als in ersteren. Dieser Grad der Wachstumshemmung steigert sich in den ersten Stunden bis zu einer gewissen Höhe, um dann allmählich, wie bereits mehrfach ausgeführt in eine Wachstumsförderung umzuschlagen.

Vor einer Besprechung des 3. Versuchs soll die Art und Weise näher erläutert werden, nach welcher die zur Erzeugung einer Generation nötigen Zeiten berechnet wurden. An Cholerabakterien sind derartige Berechnungen zuerst von Buchner[1]) angestellt worden. Man geht von der Voraussetzung aus, dass die Keime sich in Potenzen von 2 vermehren. Würden z. B. aus 2 Keimen in 3h deren 8, so wären aus 1 Generation in dieser Zeit deren 3 geworden. Neu erzeugt wären demnach 2 Generationen. Hätte man nun folgende Keimzahlen (Versuch 3, Mittelwerte aus Tropfgläsern II und 2)

Zu Beginn des Versuches	1
nach 3h	6,2
„ 21h	283000
„ 24h	362000,

so entständen in den ersten 3h aus 1 Keim deren 6,2, aus 2 Keimen demnach 12,4. Unter obiger Voraussetzung wäre

[1]) Buchner, Longard und Riedlin, Ueber die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. 1887. Band II. S. 1.

dann $2 \cdot 2 \ldots . = 12{,}4$ oder $2^n = 12{,}4$. Demnach wäre $n = \frac{\log 12{,}4}{\log 2} = 3{,}64$. Aus einer Generation wären 3,64 geworden. Neugebildet wären demnach in diesen 3 h 2,64 Generationen. Zur Bildung einer Generation hätte es bedurft $\frac{180}{264}$ min = 68 min = 1 h 8 min. Nach 21 h Wachstum fänden sich in derselben Lösung 283000 Keime. Nach 24 h, also in 3 h, wären hieraus 362000 Keime geworden. Aus 1 Keime würden daher in dieser Zeit $\frac{362000}{283000} = 1{,}27$, aus 2 Keimen aber 2,54 Individuen. Es wäre demnach $\frac{\log 2{,}54}{\log 2} = 1{,}35$. Statt 1 Generation nach 21 h fänden sich nach 24 h 1,35 Generationen. Neu erzeugt worden wären daher in diesen 3 h 0,35 Generationen. Die Erzeugung einer ganzen Generation hätte $\frac{180}{0{,}35}$ min = 514 min = 8 h 34 min gedauert. Durch Festlegung dieser zur Bildung eines neuen Geschlechtes erforderlichen Zeiten bekommt man ein klares Bild über die Geschwindigkeit, mit der sich die Bakterien in gewissen Zeitabschnitten vermehren. Beim 3. Versuche sind die Keimzahlen aus dem phenolphthaleinneutralen Fleischwasser ihrer Lückenhaftigkeit halber nicht berücksichtigt worden.

Aus den beiden ersten Versuchen ergab sich von selbst die weitere Fragestellung. Wie verändert sich in den ersten 24 h die Vermehrungsgeschwindigkeit der Keime in ein und derselben Lösung, und welche näheren Beziehungen bestehen zwischen der Reaktion des Nährbodens und dieser Vermehrungsgeschwindigkeit? Einer Erledigung dieser Probleme konnte man nur dann näher kommen, wenn man in möglichst kleinen Zeitabschnitten quantitative Keimbestimmungen machte, und aus den erhaltenen Zahlen die

Tabelle 8. Versuch 3.

Aussaat	2000	1700	1900	2200	2000	2100	2100
Azidität	neutral	1,5 cc% N. L.	1,5 cc% N. L	3,0 cc% N. L.	3,0 cc% N. L.	4,5 cc% N. L.	4,5 cc% N. L.
Versuch	Tr. Gl. I	Tr. Gl. II	Tr. Gl 2	Tr. Gl. III	Tr. Gl. 3	Tr. Gl. IV	Tr. Gl. 4
Zu Beginn	1	1	1	1	1	1	1
nach 3 h	3	6,2	—	3,6	—	—	2,1
„ 6 h	8,4	113	111	55	62	10	16
„ 9 h	—	4 000	2 400	167	—	53	57
„ 12 h	—	23 100	30 000	—	—	351	331
„ 15 h	—	91 800	—	97 700	46 000	2 400	—
„ 18 h	193 000	200 000	224 000	124 100	171 000	9 500	5 700
„ 21 h	140 000	311 000	255 000	165 500	187 000	40 000	32 400
„ 24 h	220 000	429 000	294 000	197 000	200 000	74 000	98 000

in dem betreffenden Abschnitt erzeugten Generationen sowie die zur Bildung einer Generation nötige Zeit berechnete. Im 3. Versuch wurden daher aller 3 h Keimzählungen vorgenommen (Tabellen 8 und 9).

Tabelle 9. Versuch 3

	1,5 cc% N. NaOH	3,0 cc% N. NaOH	4,5 cc% N. Na OH
Generationen von der 1.—3. h	2,64	1,85	1,07
Dauer einer Generationsbildung	1 h 8 min	1 h 37 min	2 h 48 min
Generationen in der 3.—6. h.	4,17	4,04	2,64
Dauer einer Generationsbildung	43 min	45 min	1 h 8 min
Generationen in der 6.—9. h.	4,86	1,50	2,08
Dauer einer Generationsbildung	37 min	2 h	1 h 27 min
Generationen in der 9.—12. h	3	—	2,64
Dauer einer Generationsbildung	1 h	—	1 h 8 min
Generationen in der 12.—15. h	1,81	—	2,82
Dauer einer Generationsbildung	1 h 39 min	—	1 h 4 min
Generationen in der 15—18. h	1,32	1,01	1,67
Dauer einer Generationsbildung	2 h 16 min	2 h 58 min	1 h 48 min
Generationen in der 18.—21. h.	0,41	0,25	2,25
Dauer einer Generationsbildung	7 h 19 min	12 h	1 h 20 min
Generationen in der 21.—24 h.	0,35	0,19	1,25
Dauer einer Generationsbildung	8 h 34 min	15 h 47 m.	2 h 24 min

Die höchsten Keimzahlen nach 24 h finden sich in dem der phenolphthaleinneutralen Bouillon nahestehendem Fleischwasser von 1,5 cc % Normalnatronlauge-Azidität. Hieran schliesst sich das Wachstum im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser und in dem von 3,0 cc % Normalnatronlauge-Azidität. Wesentlich geringere Keimzahlen finden sich nach 24 h im natürlich sauren Fleischwasser. Berechnet man die zur Erzeugung einer Generation nötigen Zeiten in den verschiedenen Lösungen, so finden sich wieder mit aller Deutlichkeit die aus den ersten beiden Versuchen abgeleiteten Sätze bestätigt. die in der günstigen Lösung von 1,5 cc % Normallauge-Azidität, erreichten hohen Keimzahlen beruhen auf der intensiven Vermehrung der Bakterien während der ersten 9 h. Von dieser Zeit an wird die Vermehrung wieder langsamer, um dann von der 18. h an ganz rapid abzunehmen. Aehnliche Verhältnisse finden sich im Fleischwasser von 3.0 cc % Normallauge-Azidität, erst eine zunehmende Steigerung der Vermehrung, hier nur bis zur 6. h, dann eine Abnahme und fast gänzlicher Stillstand von der 18. h an. In der natürlich sauren Bouillon erfolgt die langsamste Vermehrung in den ersten 3 h; dann teilen sich die Keime rascher, um erst in den letzten 3 h wieder an Vermehrungskraft einzubüssen. Immerhin erfolgt in diesen letzten 3 h noch eine bedeutend raschere Vermehrung als in den Lösungen mit Alkalizusätzen. Die Aenderungen in der Vermehrungsgeschwindigkeit, Abnahme nach anfänglich rascher Vermehrung in den einen und Zunahme nach erst langsamer Teilung der Keime in den anderen Nährmedien, stehen also in engen Beziehungen zur Reaktion der Nährböden.

Es lohnt sich noch, einen Blick auf die Verhältnisse zwischen den Aziditäten der Nährlösungen und den in 24 h bei gleicher Aussaat erreichten absoluten Keimmengen sowie den in dieser Zeit gebildeten Generationen zu werfen. Die Säure-

grade verhalten sich wie 0 : 1 : 2 : 3, die Mittelwerte der absoluten Keimzahlen wie 3 : 4 : 2 : 1, also nahezu umgekehrt proportional wie die Aziditäten. Generationen sind in dieser Zeit gebildet worden in der Lösung von 1,5 cc % Normalnatronlauge-Azidität 18,56, in der doppelt so sauren 16,59, in der 3fach sauren 16,42 Generationen. Stoffwechselprodukte in den Lösungen mit Alkalizusätzen und gesteigerte Vermehrung in den sauren Nährböden gleichen die starken Unterschiede, wie sie noch in den erreichten absoluten Keimzahlen deutlich sich ausprägen, in den erzeugten Generationen fast völlig aus.

5. Das Verhalten der Cholerakeime in flüssigen Nährböden verschiedener Reaktion im höheren Alter.

Unter dieser Ueberschrift soll das Verhalten der Keime in den Lösungen vom 2. Tage ab besprochen werden.

Eine Anzahl von Keimzahlen musste als unzuverlässig aus den Versuchsreihen ausgeschaltet werden. Es sind das jene Zahlen, zu deren Bestimmung ein durch Absorption mit CO_2 angereicherte Aufschwemmungsflüssigkeit benutzt woreen war. Nach vielfachen Untersuchungen wirkt die CO_2 entwicklungshemmend, in höherer Konzentration als Protoplasmagift auch direkt tötend auf die Bakterien ein. Die betreffenden Zahlen sind daher durchweg zu niedrig bemessen.

Bei den verschiedenen Keimmengen ist das absolute Maximum der erreichten Keimzahlen sowie die Zeit, nach der dies Maximum erreicht wird, zu beachten. Im Einzelnen zeigen die in Betracht kommenden Versuche wesentliche Abweichungen von einander.

Beim ersten Versuche fallen die hohen Zahlenwerte in den sauren Lösungen auf. Dieselben übertreffen zum Teil sogar die in den alkalireichen Nährmedien. Ihnen schliessen sich erst die Werte der phenolphthaleinneutralen und dann die der

Tabelle 10. Versuch 1.

Keimzahlen	neutral	0,725 cc % N NaOH	2,175 cc % N. NaOH	2,9 cc % N. NaOH
bei d. Aussaat	18300	18300	18300	18300
zu Beginn	19400	16900	12000	8900
nach 24 h	739 M.	962 M.	892 M.	357 M.
„ 2 d	823 „	**1414** „	794 „	794 „
„ 4 d	—	—	—	—
„ 7 d	**2025** M.	748 M.	1499 „	1008 „
„ 8 d	1126 M.	880 „	**2318** „	1854 „
„ 10 d	386 „	427 „	719 „	**2410** „

Bouillon von 0,725 cc % Normalnatronlauge-Azidität an. Das Maximum wird erreicht im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser nach 7 Tagen, in dem von 0,725 cc % Normalnatronlauge-Azidität nach 8—9 Tagen. Es würde sich also beim ersten Versuch der Einfluss der Reaktion in dem Sinne geltend machen, dass das Maximum in den sauren Lösungen im Vergleich zu den Nährböden mit Alkalizusätzen am spätesten erreicht wird. Möglicherweise haben die hohen Aussaatmengen und die in den alkalireichen Lösungen durch die starke Vermehrung während der ersten 24 h in grosser Menge gebildeten

Tabelle 11. Versuch 2.

Keimzahlen	neutral		0,65 cc % N. Na OH		1,95 cc % N.Na OH		2,6 cc % N.Na OH	
	I	1	II	2	III	3	IV	4
Zu Beginn	1	1	1	1	1	1	1	1
	(3100)	(2800)	(2800)	(2800)	(3300)	(2900)	(3400)	(2500)
nach 24 h	102000	189000	95000	140000	—	93000	**75000**	78000
„ 2 d	241000	275000	**239000**	**188000**	73000	109000	74000	**92000**
„ 4 d	**425000**	**592000**	233000	**196000**		—	54000	86000
„ 7 d	247000	365000	—	—	93000	122000	49000	60000
„ 10 d	137000	132000	201000	**201000**	100000	157000	42000	47000
„ 13 d	45000	91000	85000	104000	**142000**	**196000**	9000	27000
„ 20 d	68000	91000	84000	95000	131000	131000	9000	23000

Stoffwechselprodukte eine weitere Vermehrung der Keime in den neutralen Lösungen hintenangehalten und so dies unerwartete Resultat herbeigeführt.

Beim 2. Versuch finden sich die höchsten erreichten Keimzahlen im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser. Von hier fallen die Maxima der Zahlen parallel dem Steigen der Azidität zum sauren. Das Keimmaximum wird erreicht in der phenolphthaleinneutralen Bouillon nach 4 Tagen, in der ihr nahestehenden von 0,65 cc % Normalnatronlauge nach 2—10 Tagen, in den sauren Lösungen dagegen zu verschiedenen Zeiten, in der von 1,95 cc % Normalnatronlauge in langsamem Steigen nach 13 Tagen, im natürlich sauren Fleischwasser von 2,6 cc % Normalnatronlauge-Azidität schon nach 1—2 Tagen. Bei einem Vergleich der Keimmaxima in letzteren beiden Lösungen, deren Aziditäten sich nur wie 3 : 4 verhalten, kann man die weitgehende Wirkung auch eines geringen Alkalizusatzes zum sauren Fleischwasser beobachten. Im natürlich sauren Fleischwasser wird eine nur halb so grosse Keimzahl erreicht als in dem von 1,95 cc % Normalnatronlauge Azidität. In den Lösungen mit Alkalizusätzen wird sowohl die Höhe des Keimmaximums als die Zeit, nach der dasselbe erreicht wird, von der Grösse des Zusatzes bestimmt.

Lehrreich ist es, die Anzahl der in den Nährlösungen überhaupt gebildeten Generationen mit einander zu vergleichen. Es wurden gebildet

in der phenolphthaleinneutralen Bouillon 19 Generationen in 4 d,
im Fleischw. von 0,65 cc % Normal NaOH 17,58 „ in 2—10 d,
„ „ „ 1,95 cc % „ 17,54 „ in 13 d,
„ „ „ 2,6 cc % „ 16,55 „ in 2 d.

Die Generationen fallen der Zahl nach deutlich vom neutralen Fleischwasser zum sauren. Die Differenzen sind aber langenicht so gross wie die zwischen den Aziditäten.

Gesteigerte Vermehrung in den sauren und Wirkung der Stoffwechselprodukte in den neutralen Lösungen bedingen, wie schon mehrfach ausgeführt, dieses Verhalten der Keime.

Eine Beachtung verdienen weiter die Verhältnisse nach Erreichung der Maximalkeimzahlen. Es finden sich

im phenolphthaleinneutr. Fleischw. 3 d nach Erreich. d. Max. 60 %
„ Fleischw. v. 0,65 cc % Norm.NaON 3 d „ „ „ „ 52 %
„ 3fach sauren Fleischwasser 7 d „ „ „ „ 78 %
„ 4fach „ „ 5 d „ „ „ „ 66 %

der Keime wieder. Die Bakterien gehen also in den sauren Lösungen langsamer zugrunde als in den neutralen. Die erreichten Keimmengen verhalten sich in den 4 Lösungen wie 6 : 2,6 : 2 : 1. Es müssen daher zur Erklärung der erwähnten Thatsche wohl wieder die Stoffwechselprodukte herangezogen werden, da sie natürlich in den neutralen Nährlösungen in viel grösserer Menge gebildet werden als in den sauren. Ihr verderblicher Einfluss bedingt die rasche Keimabnahme in den Nährsubstraten mit Alkalizusätzen.

Bemerkenswert erscheint endlich noch der Umstand, dass sich die Maximalkeimwerte fast mathematisch genau umgekehrt proportional den Aziditäten der Lösungen verhalten (0 : 1 : 3 : 4 = 6 : 2,6 : 2 : 1).

7. Das Verhalten der Cholerakeime in Nährlösungen mit verschiedenen Alkalizusätzen über den Neutralpunkt.

Zur Herstellung der Nährböden wurde saures Fleischwasser mit Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion neutralisiert. Zu weiteren Alkalizusätzen wurde Soda benutzt. Der Grad der Alkalinität wurde auf NaOH berechnet. Das Wachstum der Keime wurde in Lösungen mit 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 % Alkalizusatz geprüft.

Tabelle 12. Versuch 4.

Keimzahlen	0,1% Alkali	0,2% Alkali	0,3% Alkali	0,4% Alkali
zu Beginn	190000	169000	156000	139000
nach 3 h	253000	160000	62000	24000
„ 6 h	14 M.	665000	73000	15000
„ 24 h	520 „	69 M.	1,8 M.	10000

Wenn auch die Keimaussaat nicht bekannt ist, so lehrt doch ein Blick auf Tabelle 12, dass mindestens die Lösungen von 0,2—0,4% Alkalizusatz sofort in steigender Weise bakterientötend gewirkt haben. Diese Wirkung ist aufgehoben, bezüglich eine Vermehrung hat eingesetzt bei 0,1% Alkalizusatz nach 3 h, bei 0,2% nach 6 h, bei 0,3% ebenfalls nach 6 h; bei 0,4% Alkalizusatz wirkt die Lösung noch nach 24 h bakterizid. Die Keimzahlen nach 24 h fallen in scharfen Absätzen von der Lösung mit 0,1% Alkalizusatz zu der mit 0,4%. Als günstiger Nährboden kann daher nur Fleischwasser mit höchstens 1% Alkalizusatz über den Phenolphthaleinneutralpunkt bezeichnet werden. Beim ersten Versuch wurden in der neutralen Bouillon bei einer Anfangskeimzahl von 19400 Bakterien nach 24 h aus einem Individuum deren 38000, beim vorliegenden Versuch im Fleischwasser mit 0,1% Alkalizusatz über den Neutralpuukt bei einer Anfangskeimzahl von 190000 Keimen aus 1 Individuum deren 2700. Wenngleich der verschieden grossen Aussaat wegen die beiden Versuche nicht mit einander verglichen werden dürfen, so weist doch der grosse Zahlenunterschied der Keime nach 24 h darauf hin, dass die Vermehrung in der phenolphthaleinneutralen Bouillon rascher vor sich geht, als wenn man noch Alkalizusätze über den Neutralpunkt hinaus macht. Eine Bestätigung hierfür bringt der 5. Versuch.

8. Ueber den Einfluss von Pepton, Kochsalz und Alkali auf die Vermehrung der Cholerakeime im Verhältnis zum Wachstum im phenolphthaleinneutralem Fleischwasser.

Tabelle 13. Versuch 5.

Keimzahlen	Fleischwasser neutral für Phenolphthalein	Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,1% Alkalizusatz	2%iges Peptonwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,5% Kochsalz	2%iges Peptonwasser neutral für Phenolphthalein ohne Kochsalz	2%iges Peptonwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,1% Alkalizusatz
Zu Beginn	550	450	300	190	160
nach 3 h	620	350	70	2	10
„ 6 h	10600	1100	160	0	80
„ 9 h	133800	16200	3100	0	70
„ 12 h	—	—	13 M.	0	430
„ 2 d	1420 M.	332 M.	268 „	0	4,8 M.

Die Resultate lassen sich kurz in folgenden Sätzen aussprechen:

1. Von den gewählten Lösungen ist nur im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser nach 3 h schon eine Vermehrung der Cholerakeime zu konstatieren. Die Vermehrung schreitet hier am schnellsten fort und führt nach 2 Tagen zur bei weitem höchsten Keimzahl.

2. Im Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,1% Alkalizusatz findet eine langsamere und im Verlaufe zweier Tage weniger ausgiebige Vermehrung der Cholerakeime statt als in der phenolphthaleinneutralen Bouillon ohne Alkalizusatz.

3. Im 2%igen Peptonwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,5% Kochsalzzusatz beginnt die Vermehrung der Cholerakeime später und ist in 2 Tagen weniger ausgiebig als im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser. Dieses Peptonwasser stellt ohne Kochsalz keinen Nährboden für die Choleravibrionen

dar. Giebt man an Stelle von Kochsalz einen Zusatz von 0,1% Alkali in Form von Soda, so findet zwar schliesslich eine Vermehrung der Keime statt, aber bei weitem nicht so ausgiebig, als im ersterwähnten Peptonwasser.

9. Zusammenfassung.

Die höchste Azidität der geprüften Nährlösungen war die des natürlich sauren Fleischwassers. Dieselbe betrug bis 4,5 cc % Normalnatronlauge. Der höchste Alkalizusatz war der von 0,4% in Form von Soda auf Na OH berechnet zum mit Normalnatronlauge bis zur Phenolphthaleinreaktion neutralisierten Fleischwasser.

Am folgeschwersten für die spätere Vermehrung der Choleravibrionen erwies sich der Einfluss der Reaktion des Nährbodens während der ersten Zeit, etwa während der ersten 9—12 h. Zur Ausbildung der vollen Wirkung der Reaktion bedurfte es bei den gewählten kleinen Aziditätsschwankungen eines gewissen in verschiedenen Grenzen schwankenden Zeitraumes. Derselbe betrug bei hoher Aussaat nur wenige Minuten, bei geringerer mehrere Stunden. Kam der Einfluss der Reaktion zum Ausdruck, so sanken die Keimzahlen parallel dem Steigen der Aziditäten von den neutralen Lösungen zu den sauren. Eine Keimvermehrung fand in allen Nährböden statt. Sie begann auch in den sauren Lösungen bei geringer Aussaat früher als bei hoher. Von grosser Bedeutung für die Vermehrung der Keime war die Zahl der ausgesäten Keime ferner insofern, als die binnen 24 h erreichte Zahl der Individuen um so kleiner war, je grösser die Aussaat gewesen war. Dies Moment überwog zuweilen den Einfluss der Reaktion, sodass die einzelnen Versuche unter einander nicht vergleichbar waren. Bei hoher Aussaat hielt der keimtötende Einfluss der höheren

Aziditäten nur während der ersten 3 h an. In den nächsten 6 h wirkte die saure Reaktion der betreffenden Lösungen nur vermehrungshemmend, in den weiteren 15 h dagegen vermehrungsfördernd. Dies Gesetz bestätigte sich auch in den Versuchen mit geringer Keimaussaat Die Individuen, welche sich der sauren Reaktion des Nährbodens anpassen konnten, vermochten sich schliesslich schneller zu vermehren als die in den Lösungen mit Alkalizusätzen bis zum Neutralpunkt. Die absolut grösste Fortpflanzungsgeschwindigkeit fand sich in der phenolphthaleinneutralen Bouillon und den ihr nahestehenden Fleischwasserlösungen von 0,65 cc % beim 2. und 1,5 cc % beim 3. Versuch übereinstimmend in der 6.—9. h. Um diese Zeit waren die Zahlenunterschiede zwischen den Keimen in den verschiedenen Lösungen am grössten. Dann kam es durch Einfluss der Stoffwechselprodukte in den neutralen und durch gesteigerte Vermehrung in den sauren Nährböden zu einem Ausgleich der Reaktionswirkung. Die langsamste Vermehrung innerhalb der ersten 24 h fand sich im natürlich sauren Fleischwasser während der ersten 3 h. Die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Keime wurde in allen Lösungen nach ungefähr 24 h wesentlich geringer als vor diesem Zeitpunkte. Was die absolute Höhe der erreichten Keimzahlen anbetraf, so ergaben die Versuche verschiedene Resultate. In dem einen mit hoher Aussaat raten in den sauren Lösungen, wenn auch einige Tage später, höhere Zahlen auf als in den neutralen. Möglicherweise hatten die in den neutralen Lösungen durch starke Vermehrung während der ersten 24 h in grosser Menge gebildeten Stoffwechselprodukte eine weitergehende Teilung der Bakterien aufgehalten. Bei einem anderen Versuch mit geringer Aussaat fanden sich die absolut höchsten Zahlen im phenolphthaleinneutralen Fleischwasser. Je

kleiner im übrigen der Alkalizusatz zum sauren Fleischwasser war, um so geringer waren die erreichten Maximalkeimzahlen, und um so grösser war die Zeit, in der sie erreicht wurden. Im natürlich sauren Fleischwasser wurde das geringste Keimzahlmaximum in der kürzesten Zeit erreicht. Gegenüber der Azidität der natürlich sauren Bouillon rief schon ein ganz geringer Alkalizusatz, der die Azidität um 0,65 cc % Normalnatronlauge herabsetzte, eine 10 Tage länger andauernde zur doppelten Keimzahl führende Vermehrung hervor. Die Maximalkeimwerte verhielten sich fast mathematisch genau umgekehrt proportional den Aziditäten der Lösungen. Die in den Nährböden verschiedener Reaktion gebildeten Generationen fielen der Zahl nach vom neutralen Fleischwasser zum sauren. Doch waren die Abstufungen lange nicht so gross, als die zwischen den Aziditäten der betreffenden Lösungen. Gesteigerte Vermehrung in den sauren und Wirkung der Stoffwechselprodukte in den neutralen Nährsubstraten bedingten auch diese Erscheinung. Nach Erreichung des Keimzahlmaximums gingen die Bakterien in den sauren Lösungen langsamer zugrunde als in den neutralen. Zur Erklärung mussten wieder um die in den neutralen Lösungen reichlicher gebildeter Stoffwechselprodukte herangezogen werden. Unter den geprüften Nährböden erwies sich in Bezug auf Vermehrungsintensität für Cholerakeime am günstigsten das phenolphthaleinneutrale Fleischwasser. Es stellte ein besseres Nährsubstrat dar, als wenn ein Zusatz von 0,1% Alkali über den Neutralpunkt gemacht wurde. Fleischwasser mit 0,4% Alkalizusatz über diesen Punkt liess im Verlauf zweier Tage keine Keimvermehrung zu, wirkte im Gegenteil in dieser Zeit bakterizid. 2%iges phenolphthaleinneutrales Peptonwasser mit

0,5% Kochsalzzusatz war lange kein so guter Nährboden wie phenolphthaleinneutrales Fleischwasser. Ohne den Kochsalzzusatz war es als Nährboden überhaupt nicht zu gebrauchen. Ein Zusatz von 0,1% Alkali zum neutralen 2%igen Peptonwasser liess zwar schliesslich eine Vermehrung der Keime zu, vermochte aber den Kochsalzzusatz nicht zu ersetzen.

„Dass alkalische Bouillon auch ohne Peptonzusatz den Cholerabakterien einen weit günstigeren Nährboden darbietet, als eine auch mehrprozentige Peptonkochsalzlösung, ist eine bekannte Thatsache", sagt schon Bleisch[1]). Der hohe Wert des Peptonwassers liegt eben darin, dass es einen Nährboden darstellt, der das Wachstum der Choleravibrionen zulässt, das anderer Keime aber eine Zeit lang hintenanhält.

[1]) Bleisch, Ueber einige Fehlerquellen bei Anstellung der Choleraroreaktion und ihre Vermeidung. Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten. 1893, Band XIV. S. 111.

Zum Schlusse spreche ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Hofmann für die dauernde Ueberwachung der Versuche meinen tiefempfundenen Dank aus.

Litteratur.

1. Bericht über die Thätigkeit der zu der Erforschung der Cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandte Kommission, unter Mitwirkung von R. Koch bearbeitet von Gaffky. A. a. d. K. G. 1887, Band III.
2. Bleisch, Ueber einige Fehlerquellen bei Anstellung der Cholerarotreaktion u. ihre Vermeidung. Z. f. H. 1893, Band XIV.
3. Buchner, Longard und Riedlin, Ueber die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. C. f. B.. 1887, Band II.
4. Dahmen, Die Nährgelatine als Ursache des negativen Befundes bei Untersuchungen der Fäces auf Cholerabazillen. C. f. B. 1892, Band XII.
5. Deelemann, Der Einfluss der Reaktion des Nährbodens auf das Bakterienwachstum. A. a. d. K. G. 1897. Band XIII.
6. Ficker, Ueber Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. Z. f. H. 1899, Band XXIX.
7. Ficker, Ueber Wachstumsgeschwindigkeit des Bacterium coli commune auf Platten. Dissertation. Leipzig 1893.
8. Flügge, Die Verbreitungsweise und Verhütung der Cholera etc. Z. f. H. 1893, Band XIV.
9. Fuller, on the proper reaction of nutrient media for bacterial cultivation. Journal of the Amerikan public Health association X, 1895. Referat: C f. B. 1896. Band XX.
10. Gruber, Bakteriologische Diagnostik der Cholera und des Cholera vibrio. A. f. H. 1894, Band XX.
11. Günther, Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1898. 5. Aufl.
12. Heim. Zur Bereitungsweise von Nährmitteln. C. f. B. 1895, Band XVII.
13. Hesse, Ueber den Einfluss der Alkaleszenz des Nährbodens auf das Wachstum der Bakterien. Z. f. H. 1893, Band XV.
14. Kitasato, Ueber das Verhalten der Typhus- und Cholerabazillen zu säure- und alkalihaltigen Nährböden. Z. f. H. 1888. Band. III.
15. Lehmann und Neumann, Bakteriologische Diagnostik. 2 Aufl. 1899.
16. Maassen, Beiträge zur Differenzierung einiger dem Vibrio der asiatischen Cholera verwandter Vibrionen und kurze Angaben über eiweissfreie Nährböden von allgemeiner Anwendbarkeit. A. a. d. K. G. 1894, Band IX.

17. M. Neisser, Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. Z. f. H 1895, Band XX.
18. Petri und Maassen, Ueber die Bereitung der Nährbouilion für bakteriologische Zwecke. A. a. d. K. G. 1893, Band VIII.
19. Retter, Keimzahl und Wachstumsgeschwindigkeit der Choleraspirillen auf Platten. Dissertation, Leipzig.
20 Schultz, Zur Frage der Bereitung einiger Nährsubstrate. C. f. B. 1891, Band X.
21. Stutzer und Burri, Untersuchungen über die Bakterien der Cholera asiatica. Z. f. H. 1893, Baud XIV.
22. Stutzer, und Burri, Untersuchungen über die Einwirkung von Torfmull — sowohl bei alleiniger Anwendung desselben, wie auch mit Beigabe gewisser Zusätze — auf die Abtötung der Cholerabakterien Z. f. H. 1893, Band XIV.
23. Winkler, Ueber den Einfluss der Reaktion der Nährböden auf die Entwicklung der Bakterien. Dissertation. Würzburg 1896.

A. a. d. K. G. = Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt.
A. f. H. = Archiv für Hygiene.
C. f. B. = Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde.
Z. f. H. = Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten.

Versuchs-Tabellen.

Vorbemerkungen.

Die folgenden Tabellen enthalten die Resultate der Keimbestimmungen aus den 5 Versuchen. In den ersten 3 Kolumnen finden sich die Keimzahlen der beiden Kontrollplatten und die Mittelwerte. Um den Wert der gewonnenen Zahlen beurteilen zu können, sind auch Notizen über die Art der Plattenzählung und über die Zahl der Verdünnungen gegeben. Es bedeuten Ok. 1, Obj. 3, G 60, dass mit dem Okular 1 und dem Objektiv 3 60 Gesichtsfelder der Platte ausgezählt worden sind, Ok. N. M. 25 kl. Qu., dass in 25 Gesichtsfeldern je 1 kleines Quadrat des Okularnetzmikrometers ausgezählt wurde, Ok. N. M 30 gr. Qu., dass in 30 Gesichtsfeldern die Kolonien des von dem ganzen Okularnetzmikrometers gebildeten Quadrats gezählt wurden, und so fort. In der 5. Kolumne findet sich die Zahl der benutzten Verdünnungen. Aus dem Originale kamen 5 Tropfen in ein Tropfglas mit 25 cc Aufschwemmungsflüssigkeit, aus diesem wieder 5 Tropfen in ein ebenso hergerichtetes u. s. f. Kamen z. B. 10 Tropfen mit zur Verdünnung, so wurde dies in Form einer Proportion angegeben, z. B. 3 10:10:5. Dies bedeutet also: aus dem Original kamen 10 Tropfen in Verdünnung 1, von dieser 10 Tropfen in Verdünnung 2, von dieser 5 Tropfen in Verdünnung 3. Aus dieser wurden mit je 5 Tropfen die beiden Kontrolplatten gegossen. Die Gelatineplatten wurden fast stets mit 5 Tropfen der Keimsuspensionen hergestellt. Im anderen Falle wurde die Tropfenzahl besonders notiert, z. B. Gel. pl. 3.

Versuch 1.

Tropfglas I. 40 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	19400	19400	19400	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	0
nach 3h	16800	20300	18600	Lupe	1
„ 9h	1,918 M.	1,918 M.	1,918 M.	„	2
„ 24h	738 M.	740 M.	739 M.	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 2d	821 „	825 „	823 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 4d	469 „	446 „	458 „	Lupe	3
„ 7d	2015 „	2034 „	2025 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2 G. pl. 3
„ 8d	1101 „	1051 „	1126 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 120	3 10: 5:5
„ 10d	371 „	400 „	386 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 120	3 10: 10:5

Versuch 1.

Tropfglas II. 30 cc neutralen und 10 cc sauren Fleischwassers.

Azidität: 0,725 cc % Normalnatronlauge.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	17600	16100	16900	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	0
nach 3h	12900	17700	15300	Lupe	1
„ 9h	3,134 M.	3,034 M.	3,084 M.	„	2
„ 24h	947 M.	976 M.	962 M.	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 2d	1405 „	1422 „	1414 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 4d	707 „	744 „	726 „	Lupe	3
„ 7d	684 „	812 „	748 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2 G. pl. 3
„ 8d	819 „	940 „	880 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 120	3 10: 5:5
„ 10d	426 „	427 „	427 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 120	3 10: 10:5

Versuch 1.

Tropfglas III. 10 cc neutralen und 30 cc sauren Fleischwassers.

Azidität: 2,175 cc % Normalnatronlauge.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	10800	13200	12000	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	0
nach 3 h	7900	7600	7800	Lupe	1
„ 9 h	413000	438000	426000	„	2
„ 24 h	901 M.	882 M.	892 M.	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 2 d	771 „	817 „	794 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 4 d	547 „	494 „	521 „	Lupe	3
„ 7 d	1475 „	1523 „	1499 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2 G. pl. 3
„ 8 d	2191 „	2444 „	2318 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	3 10: 5:5
„ 10 d	600 „	838 „	719 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	3 10:10:4

Versuch 1.

Tropfglas IV. 40 cc sauren Fleischwassers.

Azidität: 2,900 cc % Normalnatronlauge.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	8100	9700	8900	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	0
nach 3 h	10300	7500	8900	Lupe	1
„ 9 h	339000	291000	315000	„	2
„ 24 h	339 M.	374 M.	357 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2
„ 2 d	798 „	789 „	794 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2
„ 4 d	488 „	547 „	518 „	Lupe	3
„ 7 d	1103 „	913 „	1008 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2 G. pl. 3
„ 8 d	1885 „	1822 „	1854 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	3 10: 5:5
„ 10 d	2213 „	2607 „	2410 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	3 10:10:5

Versuch 2.

40 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein.

Tropfglas I.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2900	3200	3100	Lupe	0
nach 3h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 6h	19200	17700	18500	Lupe	1
„ 9h	203000	210000	207000	„	1
„ 24h	285 M.	346 M.	316 M.	Ok.1 Obj.3 G.30	2
„ 2d	919 „	577 „	748 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 4d	1292 „	1341 „	1317 „	Ok.4 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 7d	782 „	747 „	765 „	Ok.4 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 10d	428 „	424 „	426 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 13d	137 „	143 „	140 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 20d	218 „	206 „	212 „	Ok.1 Obj.3 G 30	2 3:5

Tropfglas 1.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2700	2900	2800	Lupe	0
nach 3h	5200	3600	4400	„	0
„ 6h	29000	22000	26000	„	1
„ 9h	286000	295000	291000	„	1
„ 24h	538 M.	517 M.	528 M.	Ok.1 Obj.3 G.30	2
„ 2d	743 „	796 „	770 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 4d	1718 „	1596 „	1657 „	Ok.4 Obj.3 G. 30	2 3:5
„ 7d	847 „	1188 „	1018 „	Ok.4 Obj.3 G 30	2 3:5
„ 10d	325 „	412 „	369 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3;5
„ 13d	278 „	232 „	255 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3:5
„ 20d	266 „	241 „	254 „	Ok.1 Obj.3 G.30	2 3:5

Versuch 2.

30 cc neutralen und 10 cc sauren Fleischwassers.
Azidität: 0,65 cc % Normalnatronlauge.
Tropfglas II.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung	
Zu Beginn	2900	2700	2800	Lupe	0	
nach 3h	4300	3800	4100	„	0	
„ 6h	14000	13000	14000	„	1	
„ 9h	135000	143000	139000	„	1	
„ 24h	306 M.	234 M.	270 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	
„ 2d	685 „	655 „	670 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 4d	585 „	716 „	651 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 7d	383 „	339 „	361 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 10d	590 „	535 „	563 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 13d	251 „	222 „	237 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 20d	261 „	209 „	235 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5

Tropfglas 2.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung	
Zu Beginn	3200	2300	2800	Lupe	0	
nach 3h	3700	2600	3200	„	0	
„ 6h	14000	18000	16000	„	1	
„ 9h	220000	204000	212000	„	1	
„ 24h	371 M.	410 M.	391 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	
„ 2d	481 „	564 „	523 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 4d	532 „	566 „	549 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 7d	480 „	437 „	459 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 10d	590 „	535 „	563 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 13d	327 „	247 „	287 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	3:5
„ 20d	277 „	255 „	266 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	3	3:5

Versuch 2.

10 cc neutralen und 30 cc sauren Fleischwassers.
Azidität 1,95 cc % Normalnatronlauge.
Tropfglas III.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	3200	3300	3300	Lupé	0
nach 3 h	2800	3100	3000	„	0
„ 6 h	13000	13000	13000	„	1
„ 9 h	82000	76000	79000	„	1
„ 24 h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	—
„ 2 d	224 M.	260 M.	242 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2
„ 4 d	128 „	156 „	142 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 7 d	334 „	278 „	306 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 10 d	345 „	313 „	329 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 13 d	487 „	451 „	469 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 20 d	425 „	436 „	431 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2 3:5

Tropfglas 3.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2900	2900	2900	Lupe	0
nach 3 h	3200	3200	3200	„	0
„ 6 h	7000	9000	8000	„	1
„ 9 h	88000	88000	88000	„	1
„ 24 h	306 M.	234 M.	270 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2
„ 2 d	280 „	354 „	317 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 4 d	259 „	249 „	254 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 7 d	397 „	311 „	354 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 10 d	350 „	558 „	454 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 13 d	586 „	551 „	569 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 10 d	355 „	406 „	381 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5

Versuch 2.
40 cc sauren Fleischwassers.
Azidität 2,6 cc % Normalnatronlauge.
Tropfglas IV.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2700	4100	3400	Lupe	0
nach 3h	verflüssigt	1700	1700	„	0
„ 6h	10000	7300	8700	„	1
„ 9h	38000	verflüssigt	38000	„	1
„ 24h	245 M.	264 M.	255 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2
„ 2d	268 „	238 „	253 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 4d	215 „	154 „	185 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 7d	144 „	185 „	165 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 10d	125 „	158 „	142 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	2 3:5
„ 13d	31 „	31 „	31 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	2 3:5
„ 20d	33 „	31 „	32 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5

Tropfglas 4.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2400	2500	2500	Lupe	0
nach 3h	3500	verflüssigt	3500	„	0
„ 6h	5500	8900	7200	„	1
„ 9h	33000	28000	31000	„	1
„ 24h	210 M.	178 M.	194 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2
„ 2d	200 „	259 „	230 „	Ok. 1 Obj 3 G. 30	2 3:5
„ 4d	232 „	199 „	216 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 7d	174 „	125 „	150 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 3:5
„ 10d	101 „	135 „	118 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	2 3:5
„ 13d	65 „	68 „	67 „	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	2 3:5
„ 20d	57 „	58 „	58 „	Lupe	2 3:5

Versuch 3.
45 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein.
Tropfglas I.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2000	1900	2000	Lupe	0
nach 3 h	5900	6000	6000	„	0
„ 6 h	16 700	16 900	16 800	Ok. 4, Obj. 3, G. 30	0
„ 9 h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 12 h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 15 h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	1 15
„ 18 h	346 M.	425 M.	386 M.	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 10
„ 21 h	308 „	252 „	280 M.	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 10
„ 24 h	528 „	349 „	439 M.	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 5

Versuch 3.
30 cc neutralen und 15 cc sauren Fleischwassers.
Azidität 1,5 cc % Normalnatronlauge.
Tropfglas II.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	1600	1700	1700	Lupe	0
nach 3 h	10 500	verflüssigt	10 500	Ok. 1, Obj. 3, G. 60	0
„ 6 h	174 500	210 700	192 600	Ok. 4, Obj. 3, O. N.	
„ 9 h	7,2 M.?	verflüssigt	7,2 M.?	M., 30 gr. Qu. Ok. N. M. 25 × je	0
„ 12 h	39,3 „	verflüssigt	39,3 „	5 kl. Qu. Ok. N. M. 25 kl. Qu.	0 0
„ 15 h	140 „?	172 M.?	156 „?	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 15
„ 18 h	345 „	335 „	340 „	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 10
„ 21 h	492 „	566 „	529 „	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 10
„ 24 h	814 „	645 „	730 „	Ok. N. M. 25 kl. Qu.	1 5

Tropfglas 2.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	1900	1900	1900	Lupe	0
nach 3h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 6h	196900	224900	210900	Ok.N.M. 30gr.Qu.	0
„ 9h	4,7 M.	4,3 M.	4,5 M.	Ok.N.M. 25kl.Qu.	0
„ 12h	57,2 „	verflüssigt	57,2 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	0
„ 15h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	1 15
„ 18h	346 M.	503 M.	425 M.	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 10
„ 21h	473 „	495 „	484 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 10
„ 24h	601 „	515 „	558 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 5

Versuch 3.

Tropfglas III. 15 cc neutralen und 30 cc sauren Fleischwassers. Azidität 3,0 cc % Normalnatronlauge.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2100	2200	2200	Lupe	0
nach 3h	8100	7900	8000	„	0
„ 6h	122000	121600	122000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0
„ 9h	435000?	301000?	368000	Ok.N.M. 30gr.Qu.	0
„ 12h	44 M.?	23 M?	34 M.?	Ok.N.M. 25kl.Qu.	0
„ 15h	215 „ ?	verflüssigt	215 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 15
„ 18h	267 „	279 M.	273 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 10
„ 21h	457 „	271 „	364 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 10
„ 24h	453 „	415 „	434 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 5

Tropfglas 3.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	1900	2000	2000	Lupe	0
nach 3h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 6h	89000	157000	123000	Ok.4 Obj.3 G.30	0
„ 9h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 12h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 15h	60 M.	121 M.?	91 M.?	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 15
„ 18h	413 „	269 „	341 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 10
„ 21h	377 „	369 „	373 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 10
„ 24h	350 „	450 „	400 „	Ok.N.M. 25kl.Qu.	1 5

Versuch 3.

Tropfglas IV. 45 cc sauren Fleischwasser.
Azidität 4,5 cc % Normalnatronlauge.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2200	2000	2100	Lupe	0
nach 3h	4700	4200	4500	„	0
„ 6h	32000	33000	33000	Ok.1 Obj.3 G.30	0
„ 9h	103700	133400	118600	Ok.4 Obj.3 G.30	0
„ 12h	729800	658800	694300	Ok.1 Obj.3 G.30	0
„ 15h	721000	1 M.	861000	Ok.4 Obj.3 G.30	1 15
„ 18h	13 M.	11 „	12 M.	Ok.N.M. 30gr.Qu.	1 10
„ 21h	25 „	111 „	68 „	Ok.N.M. 30gr.Qu.	1 10
„ 24h	203 „	207 „	205 „	Ok.N.M. 25 x je 5 kl. Qu.	1 5

Tropfglas 4.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	2100	2100	2100	Lupe	0
nach 3h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	0
„ 6h	17800	25300	21600	Ok. 1 Obj. 3 G. 60	0
„ 9h	96400	127200	111800	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	0
„ 12h	737000	verflüssigt	737000	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	0
„ 15h	5 M.	5 M.	5 M.	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	1 15
„ 18h	23 „	17 „	20 „	Ok. N.M. 30gr. Qu.	1 10
„ 21h	106 „	62 „	84 „	Ok. N.M. 25kl. Qu.	1 10
„ 24h	156 „	156 „	156 „	Ok. N.M. 25 X je 5 kl. Qu.	1 5

Versuch 4.

Tropfglas 1. 30 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,1 % Alkalizusatz.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	205000	175000	190000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0
nach 3h	263000	222000	253000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0
„ 6h	14,2 M.	14 M.	14 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	1 10
„ 24h	494 „	547 „	520 „	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2 5:5

Versuch 4.

Tropfglas 2. 40 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,2 % Alkalizusatz.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung
Zu Beginn	170000	168000	169000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0
nach 3h	160000	160000	160000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0
„ 6h	698000	632000	665000	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	1 10
„ 24h	80 M.	59 M.	69 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2 5:5

Versuch 4.

Tropfglas 3. 40 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,3 % Alkalzusatz.

Keim-zahlen	α	β	Mittel	Zählung	Ver-dünnung	
Zu Beginn	151000	160000	156000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0	
nach 3 h	62000	61000	62000	Ok. 1 Obj. 4 G. 30	0	
„ 6 h	75000	71000	73000	Lupe	1	10
„ 24 h	1,7 M.	1,8 M.	1,8 M.	„	2	5:5

Versuch 4.

Tropfglas 4. 40 cc Fleischwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,4 % Alkalizusatz.

Keim-zahlen	α	β	Mittel	Zählung	Ver-dünnung	
Zu Beginn	137000	140000	139000	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	0	
nach 3 h	26000	21000	24000	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	0	
„ 6 h	15000	14000	15000	Lupe	1	10
„ 24 h	19000	0	10000	„	2	5:5

Versuch 5.

Tropfglas 1. 40 cc Fleischwasser neutral für Phenolpthalein.

Keim-zahlen	α	β	Mittel	Zählung	Ver-dünnung	
Zu Beginn	600	500	550	Lupe	0	
nach 3 h	600	630	620	„	0	
„ 6 h	10600	10500	10600	„	1	10
„ 9 h	126300	141200	133800	„	1	10
„ 12 h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	1	5
„ 2 d	1480 M.	1359 M.	1420 M.	Ok. 4 Obj. 3 G. 30	2	5:5

Versuch 5.

Tropfglas 2. 40 cc Fleischwasser neutral mit Phenolphthalein mit 0,1 % Alkalisalz.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung	
Zu Beginn	360	530	450	Lupe	0	
nach 3 h	350	350	550	„	0	
„ 6 h	1200	900	1100	„	1	10
„ 9 h	14600	17700	16200	„	1	10
„ 12 h	verflüssigt	verflüssigt	verflüssigt	—	1	5
„ 2 d	331 M.	332 M.	332 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	2	5:5

Versuch 5.

Tropfglas 3. 40 cc 2 %iges Peptonwasser neutral für Phenolphthalein mit 0,5 % Kochsalzzusatz.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung	
Zu Beginn	300	300	300	Lupe	0	
nach 3 h	70	70	70	„	0	
„ 6 h	160	unrein	160	„	1	10
„ 9 h	3400	2800	3100	„	1	10
„ 12 h	12,6 M.	13,3 M.	13 M.	Ok. 1 Obj. 3 G. 30	1	5
„ 2 d	282 „	253 „	268 „	O. N. M. 50 kl. Qu.	1	5

Versuch 5.

Tropfglas 4. 40 cc 2 %iges Peptonwasser neutral für Phenolphthalein ohne Kochsalz.

Keimzahlen	α	β	Mittel	Zählung	Verdünnung	
Zu Beginn	170	200	190	Lupe	0	
nach 3 h	3	steril	2	„	0	
„ 6 h	steril	„	steril	—	1	10
„ 9 h	„	„	„	—	1	10
„ 12 h	„	„	„	—	1	5
„ 2 d	„	„	„	—	1	15

Lebenslauf.

Verfasser dieser Arbeit, Georg Arthur Läwen, evangelisch-lutherischer Konfession, wurde am 6. Februar 1876 zu Waldheim geboren, besuchte nach 2jährigem Aufenthalt zu Grosshennersdorf in der Ober-Lausitz von Ostern 1882 an die höhere Bürgerschule und dann das Gymnasium zu Zwickau i. S. und das Königliche Gymnasium zu Dresden-Neustadt. Nachdem er daselbst Ostern 1895 die Reifeprüfung bestanden hatte, widmete er sich nacheinander 1 Semester in Rostock, 3 in Freiburg, 2 in München und 3 in Leipzig dem Studium der Medizin. Ende Februar 1897 bestand er in Freiburg die ärztliche Vorprüfung und genügte im darauffolgenden Sommerhalbjahre seiner militärischen Dienstpflicht als Einjährig-Freiwilliger beim K. Bayerischen 1. Infanterieregiment „König“ in München. Die Approbation als Arzt erlangte er am 3. März 1900 zu Leipzig. Gegenwärtig steht er als Einjährigfreiwilliger Arzt beim 2. K. Sächsischen Ulanen-Regiment Nr. 18 zu Leipzig.

Seinen Lehrern, besonders aber Herrn Geheimrat Prof. Hofmann sowie den Herren Privatdozenten Dr. H. Braun und Dr. Ficker, spricht er für vielfache Förderung den herzlichsten Dank aus.